



Etude du rôle de la région régulatrice en 3' du locus IgH au cours du développement lymphocytaire B normal et pathologique

Alexis Saintamand

► To cite this version:

Alexis Saintamand. Etude du rôle de la région régulatrice en 3' du locus IgH au cours du développement lymphocytaire B normal et pathologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0007 . tel-01306682

HAL Id: tel-01306682

<https://theses.hal.science/tel-01306682>

Submitted on 25 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Biologie-Santé (ED n°524)

UMR CNRS 7276 – CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue publiquement par

ALEXIS SAINTAMAND

Le 08 avril 2016

Etude du rôle de la région régulatrice en 3' du locus IgH dans le développement lymphocytaire B normal et pathologique

Thèse dirigée par : **Dr Yves Denizot**

Jury :

Président du jury

Michel Cogné – Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs

Pierre Dubus – Professeur des Universités, Université de Bordeaux 2

Olivier Garraud – Professeur des Universités, Université de Saint Etienne

Examineurs

Yves Denizot – Directeur de recherche INSERM, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Biologie-Santé (ED n°524)

UMR CNRS 7276 – CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue publiquement par

ALEXIS SAINTAMAND

Le 08 avril 2016

Etude du rôle de la région régulatrice en 3' du locus IgH dans le développement lymphocytaire B normal et pathologique

Thèse dirigée par : **Dr Yves Denizot**

Jury :

Président du jury

Michel Cogné – Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs

Pierre Dubus – Professeur des Universités, Université de Bordeaux 2

Olivier Garraud – Professeur des Universités, Université de Saint Etienne

Examineurs

Yves Denizot – Directeur de recherche INSERM, Université de Limoges



Au cours de mes trois premières années de thèse, j'ai été financé par l'université de Limoges dans le cadre d'un contrat doctoral. Puis j'ai obtenu une aide individuelle « jeune chercheur » de la Fondation ARC afin de continuer mes travaux pendant une année supplémentaire.



Faculté de



Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Yves Denizot pour son encadrement au cours de ma thèse. Merci pour vos conseils, votre disponibilité et la confiance que vous m'accordé. Ces trois années et quelques mois seront finalement passés très vite (je me rappelle avoir été prévenu que ce serait le cas dès mon premier jour). La réussite de cette thèse doit beaucoup à votre encadrement, je me considère chanceux d'avoir pu en bénéficier.

Je remercie également le Pr Michel Cogné de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Ensuite je tiens à remercier le Pr Pierre Dubus et le Pr Olivier Garraud d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail et le temps que vous y avez consacré.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'UMR CNRS 7276. La thèse est certes un travail personnel, mais qui ne peut se réaliser seul. Merci donc à tous ceux qui ont pu m'apporter leur aide et leurs conseils au cours de ces années.

Merci à Eric, toujours disponible et capable de répondre à n'importe quelle question (que ce soit sur la façon de mettre au point une PCR, sur comment réparer un appareil ou sur comment traduire un mot dans 3 patois différents). Un grand merci à Claire, toujours disponible pour sauver les manips de FACS. Merci également à Laurent pour ses conseils et les discussions rugby, malgré son incompréhensible obstination à préférer le noir et blanc au jaune et bleu. Merci également à Jenny pour toutes les corrections d'Anglais, et à Seb pour les conseils en bio mol.

Je souhaite également bon courage à ceux qui n'ont pas encore soutenu, et dont le tour viendra rapidement : Anderson, Batoul, Hazar, Héloïse, Hend, Iman, Omar (grand amateur de ChIP !), Ophélie, Rachà, Zeinab. Mention spéciale pour les nouveaux entrants dans la « Denizot Team », Nour et Hussein.

Une pensée également pour ceux qui m'ont précédé de peu : Faten, Nivine et Nicolas (dit "le p'tit blond"). Je dois également citer Armand, ancien voisin de

bureau, grand amateur (ou pas) de longues sessions de FACS (et peut être futur rugbyman ?). Bon courage à vous pour la suite !

Je remercie également tous ceux sans qui le laboratoire ne pourrait pas tourner : Bernadette, Sylvie, David, Makiadi, Laurent, Séverine, Julien... Merci également à Aurore pour l'organisation de tous nos déplacements.

Merci également à toute l'équipe de Jean (anciennement l'équipe du 2nd) au sein de laquelle j'ai fait mes débuts dans l'UMR pendant mon M1. Merci à Chantal de m'avoir donné envie, après mon stage de M1, de continuer les études et de m'orienter vers un M2R puis une thèse.

Je vais maintenant remercier ceux qui auront passé le plus de temps à me supporter... Tout d'abord un grand merci aux anciens, les brivistes : Pauline, dite Sénior, qui aura passé des heures à m'apprendre tout ce qu'il faut savoir, notamment sur l'analyse de jonctions et d'hypermutations ; merci aussi à Aurélien pour ses conseils sur la ChIP et l'épigénétique. Merci aussi à Marie (Sénior Sénior), ancienne voisine de bureau et collègue de café le matin (Le seul reproche que je pourrais faire à mes anciennes voisine de bureau serait le choix de la déco, et notamment des calendriers...) Merci également à Christelle O, pour toutes les manips de western ou d'ELISA (Il y a 3 sortes de WB : the good, the bad and the ugly... et je n'ai pas vu beaucoup de "bad" ou "ugly" !). Une pensée aussi pour Christelle VF, ancienne membre de la Denizot Team revenu en terre Limousine après un exil à Marseille. Enfin un grand merci à Christian, sans qui ma thèse n'aurait pas été la même... Pour toutes les discussions sur le sport ("Je veux devenir tout rouge !") ou la "gastronomie" (« Le gras c'est la vie ! »). Désolé aussi pour toutes les fois où on t'a fait frôler l'hypolipémie !

D'un côté plus personnel, je souhaiterais remercier ma famille qui m'a soutenu pendant toutes ces (très longues) années de fac. Ca y est j'ai enfin fini les études !

Enfin mes derniers remerciements seront pour celle qui me supporte tous les jours. Je n'en dirai pas plus ici, mais simplement merci d'être là tous les jours à mes côtés.

Résumé

Durant l'ontogénie B, le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus de réarrangements géniques. Lors des phases précoces du développement B, indépendamment de la rencontre avec un antigène, les réarrangements VDJ permettent l'obtention d'un répertoire d'Ig fonctionnelles. Lors des phases tardives, l'hypermutation somatique (SHM) permet l'augmentation de l'affinité de l'Ig pour son antigène tandis que la recombinaison isotypique (CSR) modifie ses fonctions effectrices. Ces événements impliquent l'induction de lésions de l'ADN potentiellement oncogéniques, ce qui impose une régulation très stricte. Cette régulation est assurée par divers éléments *cis*-régulateurs répartis tout au long du locus IgH, dont la région régulatrice en 3' (3'RR). La 3'RR s'étend sur 30 kb et contient quatre activateurs transcriptionnels, les trois premiers formant une structure palindromique. Lors de ma thèse, j'ai utilisé plusieurs modèles murins porteurs de délétions de tout ou partie de la 3'RR pour étudier son rôle, ainsi que celui des différents éléments qui la compose lors des diverses étapes de l'ontogénie B. Nous avons pu déterminer comment la 3'RR régule précisément la CSR en ciblant spécifiquement la région *switch* acceptrice et caractériser le phénomène encore peu connu de CSR vers IgD. D'autre part, nous avons démontré l'importance de la 3'RR lors de la SHM et dans le développement des différentes sous populations lymphocytaires B. Enfin, la comparaison des résultats obtenus lors de l'analyse des différents modèles nous a permis de déterminer que la structure palindromique de la 3'RR est importante pour une SHM efficace, mais relativement dispensable lors de la CSR.

Mots clés :

Locus IgH / Ontogénie B / 3'RR / Hypermutations somatique / recombinaison isotypique

Abstract

During B-cell development, the heavy chains locus (IgH) undergoes three genic rearrangement events. During the early stages, before encountering the antigen, VDJ rearrangements allow the generation of a functional Ig repertoire. During the late stages, somatic hypermutation (SHM) increases the affinity of the Ig for its antigen, while class switch recombination (CSR) modifies its effector functions. These events imply the generation of potentially oncogenic DNA lesions, and thus require a strict regulation. This regulation is assured by several *cis*-regulatory elements spread along the IgH locus, including the 3' regulatory region (3'RR). The 3'RR extends on more than 30kb and contains four transcriptional enhancers, the first three displaying a palindromic conformation. During my PhD, I investigated several mouse models carrying deletion of part or totality of the 3'RR to investigate its role during B cell development. We demonstrated how she precisely regulates CSR by specifically targeting the acceptor switch region, and described the poorly known mechanism of CSR toward IgD. Otherwise, we have demonstrated its importance during SHM and in the correct development of the different B cell subpopulations. Finally, by comparing the results obtained during the analysis of the various mouse models, we have demonstrated that the palindromic structure of the 3'RR is required for optimal SHM, but not for CSR.

Keywords:

IgH locus / B cell development / 3'RR / Somatic hypermutations / Class switch recombination

" La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales: nous aurons beau accroître notre savoir, le reste - si infime soit-il - sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ. "

Isaac Asimov

Sommaire

<i>Remerciements</i>	
Sommaire	
Préambule.....	1
Introduction	4
Chapitre 1: La lymphopoïèse B.....	5
I) Les immunoglobulines et leur loci	5
1 Les loci des chaînes légères	5
1.a Le locus kappa	5
1.b Le locus lambda.....	5
2 Le locus des chaînes lourdes	6
3 Obtention d'une Ig fonctionnelle	7
II) Phase précoce antigène indépendante	8
1 Cellules souches hématopoïétiques.....	8
2 Stade pré-pro-B : engagement définitif dans le lignage B	9
3 Stade pro-B : réarrangement au locus IgH	9
4 Stade pré-B : réarrangements au loci IgL.....	13
5 Stade B immature : tolérance et édition du BCR	14
III) Phases tardives dépendantes de l'antigène	16
1 Stade transitionnel et " <i>B cell fate</i> "	16
1.a Stade transitionnel	16
1.b Signalisation et <i>B cell fate</i>	17
1.c IgD	18
2 Stade B mature et formation du GC	21

2.a	Les lymphocytes B1	21
2.b	Lymphocytes B de la zone marginale.....	23
2.c	Lymphocytes B Folliculaires et formation du centre germinatif.....	24
3	Différenciation finale : sécrétion d'anticorps et mémoire immunitaire	25
4	Les B régulateurs.....	26
Chapitre 2: Recombinaisons secondaires : hypermutation somatique et commutation isotypique		27
I)	AID, enzyme clé des réarrangements secondaires	27
1	Structure et fonction de l'enzyme	27
2	Régulation d'AID.....	29
2.a	Régulation transcriptionnelle.....	29
2.b	Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle.....	30
3	Recrutement d'AID aux loci d'Ig.....	31
3.a	Recrutement séquence-spécifique	31
3.b	Recrutement par des marques épigénétiques.....	32
3.c	Recrutement par la machinerie de biosynthèse de l'ARN.....	33
4	AID et déméthylation de l'ADN	37
II)	CSR ou SHM : Cassure double brin ou mutation ?.....	39
1	Prise en charge des mésappariements lors de la SHM.....	39
2	Induction de cassures doubles brins et réparation lors de la CSR.....	41
2.a	Prise en charge des DSB et formation de la synapse.....	42
2.b	Réparation des cassures doubles brins : voies du NHEJ et de l'AEJ	44
2.b.i	Voie du NHEJ.....	45
2.b.ii	Voie de l'AEJ	46
Chapitre 3: La régulation des remaniements géniques lors du développement lymphocytaire B		48
I)	Les promoteurs.....	48

1	La transcription germinale des régions variables	49
2	La transcription germinale des régions constantes.....	50
II)	Les <i>enhancers</i> transcriptionnels	51
1	L' <i>enhancer</i> intronique E μ	51
2	La région régulatrice en 3'	53
2.a	Découverte de la 3'RR	53
2.b	Structure et évolution de la 3'RR	54
2.c	Activité des <i>enhancers</i> de la 3'RR.....	55
2.d	Régulation de l'activité de la 3'RR par des facteurs <i>trans</i>	57
2.e	Rôle de la 3'RR dans l'ontogénie B	59
2.f	La 3'RR, un super- <i>enhancer</i> ?	61
III)	Les <i>isolateurs</i>	61
1	La région 5'	62
2	La région intergénique et IGCR1	62
3	Hs5 6 7	63
IV)	Régulation spatiale du locus IgH	64
1	La localisation du locus au cours du développement.....	64
2	La structure tridimensionnelle du locus	65
3	Les lncRNA et eRNA : relation entre transcription et organisation spatiale	66
Chapitre 4: Introduction à la lymphomagenèse.....		68
I)	L'origine des lymphoproliférations.....	68
1	Les lésions oncogéniques	68
2	Origine cellulaire des lymphomes.....	69
3	Hétérogénéité des tumeurs	70
II)	Les altérations oncogéniques au cours de la lymphoïèse	72
1	Translocations lors des réarrangements VDJ : implication du complexe RAG... ..	72

2	Translocation lors des réarrangements secondaires : implication de l'enzyme AID	73
3	La 3'RR lors de la lymphomagenèse	74
	Problématiques et objectifs	76
	Resultats	78
	Article 1	79
	Article 2.....	81
	Article 3.....	84
	Article 4.....	88
	Article 5.....	91
	Discussion et perspectives.....	94
	I) De nouveaux modèles pour étudier la 3'RR	95
	II) La 3'RR lors de la SHM.....	96
	III) La 3'RR lors de la CSR.....	97
	IV) Conclusion générale et perspectives	101
	Annexes.....	106
	Annexe 1 : 3'RR et lymphomagenèse.....	107
	Annexe 2 : Etude du modèle de délétion des trois premiers enhancers	109
	Bibliographie.....	110

Préambule

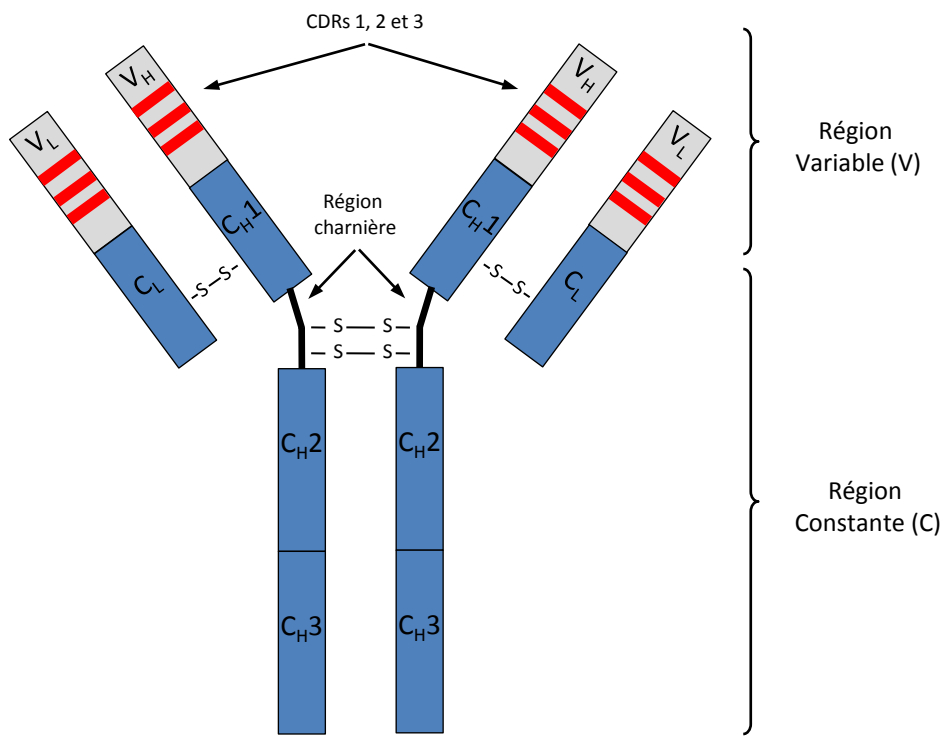


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline. Exemple d'une IgG1.

Le domaine variable (représenté en gris) est composé des régions variables des chaînes lourdes et légères (respectivement V_H et V_L). Chacun de ces domaines contient trois régions hypervariables, notées CDR 1 à 3 (représentées en rouges), séparant quatre régions moins variables (FR 1 à 4).

Le domaine constant, représenté en bleu, est composé des régions constantes des chaînes lourdes et légères (respectivement C_H et C_L). La région charnière, qui confère sa flexibilité à l'Ig, est située entre les domaines C_H1 et C_H2.

Le système immunitaire, particulièrement évolué chez les vertébrés supérieurs, a pour rôle de protéger l'organisme à la fois contre les agressions extérieures (bactéries, virus, parasites...), mais aussi contre les dysfonctionnements cellulaires pouvant aboutir au développement de tumeurs. Pour cela, il doit être capable d'identifier les différents pathogènes, tout en reconnaissant et tolérant les éléments du soi. Pour remplir son rôle, ce système complexe mobilise différents organes et types cellulaires.

On distingue deux grands types d'immunités : l'immunité innée et l'immunité adaptative. La première repose sur des barrières physiques (la peau par exemple) et une reconnaissance aspécifique de motifs communs aux pathogènes par des cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires) et par des cellules tueuses naturelles (NK pour Natural Killer). L'immunité innée, au contraire, repose sur une reconnaissance spécifique des antigènes par les lymphocytes, et possède une mémoire qui permettra une réaction plus rapide lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène. La spécificité de la réponse adaptative vient du fonctionnement des cellules qui en sont les principaux acteurs : les lymphocytes T et B, qui interviennent lors des réponses cytotoxiques et humorales.

Les lymphocytes B, qui nous intéressent plus particulièrement ici, expriment à leur surface un récepteur, le BCR (pour B Cell Receptor), composé d'une immunoglobuline associée aux protéines transmembranaires CD79a et CD79b. La reconnaissance spécifique d'un antigène par l'immunoglobuline va permettre la transduction d'un signal et l'activation du lymphocyte B.

Les immunoglobulines sont des polymères de quatre chaînes protéiques : deux chaînes lourdes (ou IgH chains, pour ImmunoGlobulin Heavy chains) et deux chaînes légères (ou IgL chains pour ImmunoGlobulin Light chains) identiques deux à deux (**Fig. 1**). Chaque type de chaîne comporte une région variable (notée V_H ou V_L), qui formera le site de reconnaissance spécifique à l'antigène, et une partie constante (C_H ou C_L), qui déterminera les fonctions effectrices de l'immunoglobuline. On distingue chez les mammifères deux types de chaînes légères, Ig κ et Ig λ , pouvant s'associer à cinq classes de chaînes lourdes : μ , δ , γ , ϵ , α , donnant respectivement des IgM, IgD, IgG, IgE et IgA.

Les IgM sont les immunoglobulines synthétisées « par défaut » par les lymphocytes B, et sont les premières à être produites lors d'une réponse immunitaire. Les IgD sont la plupart du temps co-exprimées avec les IgM, et possèdent un rôle principalement dans la réponse anti

bactérienne. L'IgG est l'isotype majeur, et possède différentes sous-classes sensiblement différentes, intervenant selon le sous type dans les réponses anti-virales, antiparasitaires et/ou anti-bactériennes. On distingue chez la souris les IgG1 (réponse anti virale et antiparasitaire), les IgG2a et IgG2b (réponse anti-virale) et les IgG3 (réponse antibactérienne). Les IgA sont essentiellement sécrétées au niveau des muqueuses, et enfin les IgE jouent un rôle crucial dans la défense anti-parasitaire, mais sont également impliquées dans les phénomènes d'hypersensibilité (*i.e* les allergies).

Le site de reconnaissance des Ig est formé par l'association des régions variables des chaînes lourdes et légères. Ces régions sont formées de 3 domaines hypervariables, appelés CDRs (pour Complementary Determining Region), et de quatre régions de variabilité moindre, nommées FR (pour Framework Region). Les fonctions effectrices des différentes classes d'Ig dépendent quant à elles des régions constantes des chaînes lourdes. Les régions V_H , V_L et C_L sont composées d'un seul domaine, tandis que le domaine C_H en comporte trois à quatre, notés C_{H1} à C_{H4} . Les formes membranaires et sécrétées des Ig diffèrent par la présence d'exons supplémentaires permettant respectivement la synthèse des parties transmembranaires et intracytoplasmiques, ou leur sécrétion. Chaque chaîne lourde, exceptées les IgM et les IgE possèdent également une région « charnière » entre les exons $CH1$ et $CH2$, leur conférant leur flexibilité (pour revue : Schroeder and Cavacini, 2010).

L'efficacité de la réponse immunitaire humorale vient de la capacité que possèdent les lymphocytes B de générer une immense diversité de récepteurs aux antigènes, capables de s'adapter virtuellement à l'ensemble des pathogènes que l'organisme est susceptible de rencontrer. Toute la problématique consiste à faire générer une grande variété d'Ig par des cellules possédant à l'origine toutes le même génome. Cette diversité est permise par la structure particulière des complexes génétiques impliqués dans la synthèse des Ig, et les capacités particulières des lymphocytes B à modifier ce génome.

La synthèse des Ig est assurée par 3 loci distincts : les loci $Ig\lambda$ et $Ig\kappa$ pour les chaînes légères, et le locus IgH pour les chaînes lourdes. Ces loci présentent une structure morcelée, non fonctionnelle dans leur conformation germinale. Ainsi, le lymphocyte B a développé la capacité d'altérer son génome, afin d'obtenir par une succession de recombinaison une chaîne d'Ig fonctionnelle. Cette capacité particulière va à l'encontre de la nécessité pour la cellule d'assurer la stabilité de son génome, et par conséquent nécessite une régulation extrêmement

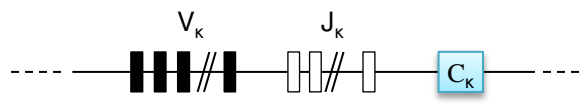
stricte, pour restreindre ces recombinaisons aux loci d'Ig, uniquement dans les lymphocytes B lors d'une réaction immunitaire.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à ces mécanismes de recombinaisons sur le locus IgH murin, et notamment à la façon dont ils sont contrôlés par des éléments *cis*-régulateurs, en particulier par la région régulatrice en 3' du locus IgH (IgH 3'RR, ou simplement 3'RR, pour 3' Regulatory Region).

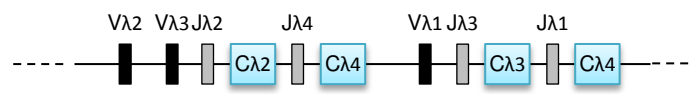
Je détaillerais dans un premier temps lors de l'introduction les différentes étapes du développement lymphocytaire B, en insistant plus particulièrement sur les phénomènes de recombinaisons géniques qui le ponctuent. Je décrirai ensuite les différents éléments *cis*-régulateurs qui assurent le contrôle de ces événements complexes. Enfin je présenterai brièvement les lymphomes B qui peuvent survenir suite à des "erreurs" lors de ces recombinaisons.

Introduction

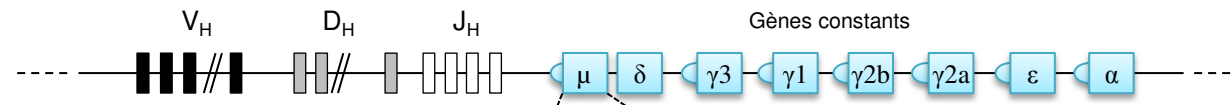
A - Locus Igk



B - Locus Igλ



C - Locus IgH



D – Segment CH : exemple de Cμ



Figure 2 : Représentation schématique des loci d'immunoglobulines.

Les segments variables (V) sont représentés en noirs, les segments de diversité (D) en gris, les segments de jonctions (J) en blanc, et les segments constants (C) en bleu.

A – Représentation du locus IgK, situé sur le chromosome 6

B – Représentation du locus Igλ, situé sur le chromosome 16

C – Représentation du locus IgH, situé sur le chromosome 12

D– Représentation détaillée d'un segment C_H, ici C_μ, avec les différents exons C_H1 à 4, suivis de l'exon de sécrétion S et des deux exons de membrane M1 et M2.

Chapitre 1: La lymphopoïèse B

I) Les immunoglobulines et leur loci

Chez la souris comme chez l'Homme, les gènes d'Ig sont regroupés en trois loci distincts, localisés sur trois chromosomes. On distingue deux loci codant les chaînes légères, le locus $Ig\kappa$ et le locus $Ig\lambda$, et un codant les chaînes lourdes, le locus IgH . Dans leur configuration germinale, ces loci sont composés d'une succession de gènes, formant différents segments : de 5' en 3', on distingue les segments de variabilité « V », les segments de diversité « D » (uniquement sur le locus IgH), les segments de jonction « J », et enfin les segments constants « C ». Les segments V(D)J codent les régions variables, tandis que les segments C codent les régions constantes des chaînes d'Ig.

Malgré les différences existant entre les différentes espèces de mammifères, les loci murins et humains possèdent une organisation très similaire, faisant de la souris un modèle d'étude idéal pour leur analyse (Hirano et al., 2011). Je détaillerai donc ici uniquement l'organisation des loci d'Ig murins, sur lesquels j'ai travaillé.

1 Les loci des chaînes légères

1.a Le locus kappa

Le locus Kappa murin ($Ig\kappa$), situé sur le chromosome 6, comporte dans sa conformation germinale 176 segments $V\kappa$ (dont 94 à 96 sont fonctionnels) et 5 segments $J\kappa$ (dont 4 fonctionnels). La région constante est codée par un seul segment $C\kappa$ (**Fig. 2A**). (Giudicelli et al., 2005; Thiebe et al., 1999)

1.b Le locus lambda

Le locus λ murin ($Ig\lambda$), situé sur le chromosome 16, possède une structure particulière. Il est constitué de trois segments $V\lambda$ et de 4 familles comprenant chacune une paire de segment $J\lambda$ et $C\lambda$ (notés chacun 1 à 4). Il est organisé en 2 clusters, parfois considérés comme

deux « sub-loci », organisés de façon ordonnée $V\lambda 2$ - $V\lambda 3$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ et $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ (**Fig. 2B**). Les différents segments $V\lambda$ s'associent préférentiellement aux segments $J\lambda$ - $C\lambda$ qu'ils précèdent, ainsi $V\lambda 2$ et 3 s'associent généralement à $J\lambda 2$ et $C\lambda 2$ ($J\lambda 4$ et $C\lambda 4$ étant défectifs), tandis que $V\lambda 1$ s'associe plus fréquemment à $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ et $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$. (Carson and Wu, 1989; Sanchez et al., 1991; Storb et al., 1989).

Seul un très faible pourcentage (environ 5%) des cellules B murines expriment une $Ig\lambda$ (contre environ un tiers chez l'homme). Cette préférence pour les $Ig\kappa$ s'explique par une plus grande probabilité d'obtenir un réarrangement productif sur le locus κ que sur le locus λ (60% vs 20% respectivement), ainsi que par une activation plus précoce du locus $Ig\kappa$ (Arakawa et al., 1996; Engel et al., 1999).

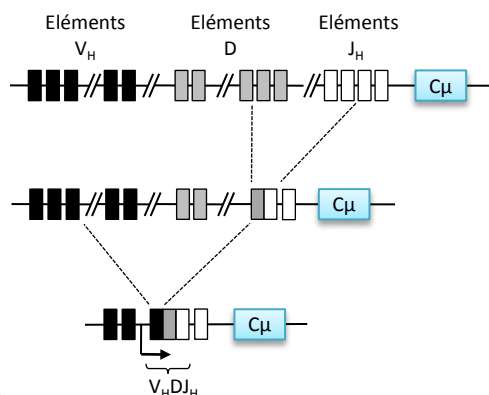
2 Le locus des chaines lourdes

Le locus des chaines lourdes (IgH) est situé sur le chromosome 12, et s'étend sur plus de trois mégabases. La formation de la région variable de la chaîne d'Ig est assurée par un exon nommé VDJ, qui est formé par l'association aléatoire de trois segments : un segment variable (V), un segment de diversité (D) et un segment de jonction (J). Du côté 5' (localisé à proximité du télomère) au côté 3', le locus contient 152 segments V_H (dont 97 sont fonctionnels) regroupés en 15 familles, 17 à 20 segments D (dont 14 sont fonctionnels) regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) et 4 segments J_H tous fonctionnels. Plus de la moitié des segments V_H appartiennent à la famille J558. (Giudicelli et al., 2005; Johnston et al., 2006). Il est également important de noter que les exons V sont précédés d'une séquence de 60 à 90pb, nommé exon L (pour Leader), qui code la majeure partie du peptide signal de la protéine.

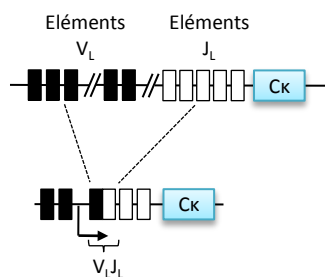
En 3' des segments VDJ, on trouve les 8 gènes codant les différents isotypes de la région constante des Ig, dans l'ordre μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ et α (**Fig. 2C**). Chaque gène est composé de plusieurs exons codant les différents domaines de chaque classe d'Ig (C_H1 à C_H3 ou C_H4 selon les isotypes) et la région charnière. Enfin, des exons indépendants codent pour les régions transmembranaires et intra-cytoplasmiques des Ig membranaires, ou pour l'exon de sécrétion des Ig sécrétées (**Fig. 2D**).

Phase précoce du développement B : Création d'un répertoire d'Ig fonctionnelles

Recombinaisons V_HDJ_H



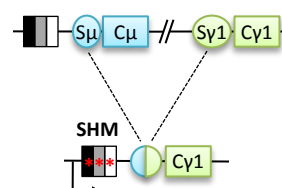
Recombinaisons V_LJ_L



Moelle osseuse

Phase tardive du développement B

Recombinaison isotypique et hypermutation somatique



Organes lymphoïdes
secondaires

Figure 3 : Représentation schématique des événements de recombinaison de la lymphopoïèse B.

Lors des phases précoces, qui précèdent la rencontre avec l'antigène, ont lieu les réarrangements V_HDJ_H et V_LJ_L (ici V_KJ_K) qui permettent l'expression d'une Ig fonctionnelle, et donc d'un BCR.

Lors des phases tardives du développement B, en présence de l'antigène, ont lieu les phénomènes de SHM et de CSR, visant à optimiser l'affinité du récepteur pour l'antigène et à modifier l'isotype d'Ig exprimée.

Des éléments cis-régulateurs, contrôlant l'expression des gènes des chaînes lourdes d'Ig sont disséminés tout au long du locus IgH. Ces éléments seront décrits en détails dans le chapitre 3.

3 Obtention d'une Ig fonctionnelle

Dans leur conformation germinale, les loci d'Ig sont non fonctionnels. Ils doivent ainsi subir plusieurs événements géniques de recombinaison pour permettre l'expression de chaînes d'Ig fonctionnelles par le lymphocyte B (**Fig. 3**).

Ces événements ponctuent la lymphopoïèse. On distingue les événements dits « précoces », qui ont lieu dans la moelle osseuse et précèdent la rencontre avec l'antigène, des événements dits « tardifs », qui ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, plaques de Peyer et ganglions lymphatiques) après la rencontre avec l'antigène. (Pieper et al., 2013)

Les événements précoces contiennent les recombinaisons V_LJ_L et V_HDJ_H , respectivement sur les loci de chaînes légères et lourdes. Les segments codant la partie variable vont ainsi être réarrangés pour former des exons VJ et VDJ fonctionnels, et permettre l'expression d'une immunoglobuline, et donc d'un BCR fonctionnel. (Pour revue: Jung et al., 2006; Schlissel, 2004)

Les événements tardifs regroupent les mécanismes de recombinaison isotypique (CSR, pour Class Switch Recombination, ou simplement « switch ») et d'hypermutation somatique (SHM, pour Somatic HyperMutation). La CSR, qui a lieu uniquement sur le locus IgH, va permettre l'expression d'une Ig d'isotype différent de l'IgM, isotype sécrété « par défaut » en premier lieu lors d'une réponse immune, grâce à une recombinaison entre les gènes codant la partie constante des chaînes lourdes d'Ig (Xu et al., 2012b). La SHM permet l'introduction de mutations à des fréquences élevées dans les régions codant la partie variable de l'Ig, afin de modifier le site de liaison à l'antigène. (Pour revue : Maul and Gearhart, 2010). Ces événements vont permettre de diversifier le répertoire antigénique pour optimiser l'efficacité de la réponse immune, d'une part en augmentant l'affinité de l'Ig pour l'antigène, et d'autre part en adaptant ses fonctions effectrices.

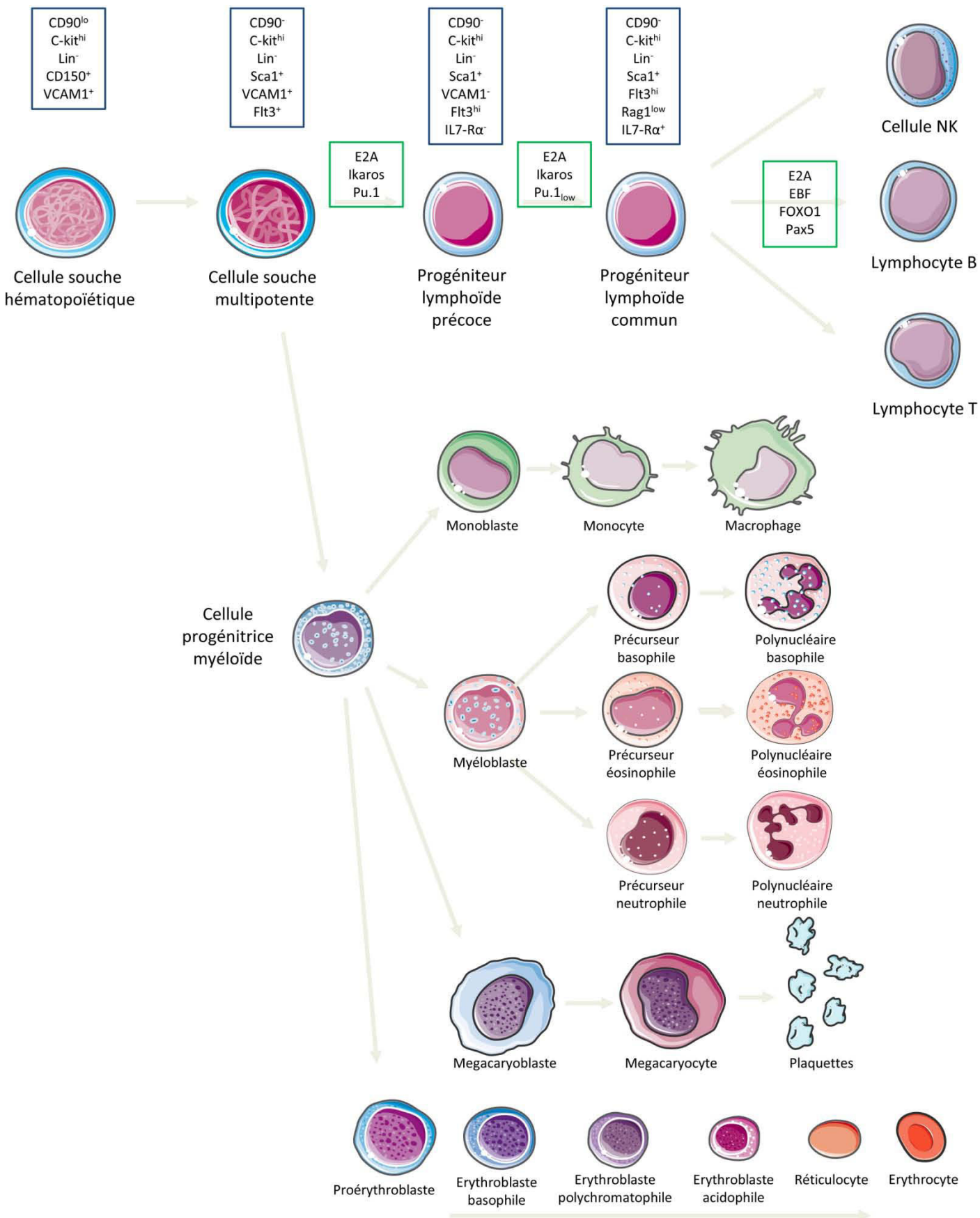


Figure 4 : Origine de la lignée lymphocytaire B.

Toutes les cellules sanguines sont issues de cellules souches multipotentes, elles mêmes issues de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules, sous l'influence de facteurs de transcriptions, vont progressivement s'engager dans la lignée lymphoïde, en formant des précurseurs communs aux lymphocytes T et B, mais aussi aux cellules NK, avant de se différencier en pré-pro B et ainsi entamer leur différenciation en lymphocytes B.

II) Phase précoce antigène indépendante

1 Cellules souches hématopoïétiques

Les lymphocytes B sont issus d'une population de cellules souches, nommées cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui possèdent une forte capacité d'auto-renouvellement et sont capables de générer toutes les lignées cellulaires sanguines (**Fig. 4**) (Pour revue : Hardy et al., 2007). Les premières cellules hématopoïétiques apparaissent chez la souris à J7,5 lors du développement embryonnaire, lors de la mise en place de la circulation sanguine. Cette première vague d'hématopoïèse ne contient aucun lymphocyte. Les premières cellules lymphoïdes vont apparaître lors d'une deuxième vague d'hématopoïèse qui aura lieu à J12,5, principalement dans le foie fœtal. A partir de J13,5, le développement osseux est suffisamment avancé pour permettre l'apparition d'un environnement adapté à l'apparition « définitive » de l'hématopoïèse dans la moelle, où elle se déroulera tout au long de la vie de l'organisme (Pour revue : Tsuneto et al., 2014).

Ces cellules souches hématopoïétiques vont se différencier dans un premier temps en progéniteurs multipotents, toujours capables de se différencier en cellules des différents lignages, mais ayant perdu leur capacité d'auto-renouvellement. Ces cellules vont ensuite, sous l'influence de facteurs de transcription (E2A, Ikaros, PU.1), commencer à s'engager dans des lignées différentes, et ainsi former des progéniteurs myéloïdes ou des progéniteurs lymphoïdes précoces (ELP pour Early Lymphoid Progenitor). Ces derniers, toujours sous le contrôle d'E2A, Ikaros et PU.1, vont progressivement acquérir l'expression du récepteur à l'IL7 et de Rag1, formant la population des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP, pour Common Lymphoid Progenitor), à l'origine des lymphocytes T et B et des cellules NK et dendritiques (Pour revue : Hardy et al., 2007; Miyazaki et al., 2014; Nutt and Kee, 2007).

L'engagement dans la lignée B va se faire sous l'influence de quatre facteurs de transcription : E2A, EBF1, Pax5 et FOXO1, qui vont favoriser la différenciation lymphocytaire B tout en réprimant les lignées T et NK. Plus précisément, la stimulation des progéniteurs lymphoïdes communs par l'IL7 va induire l'expression d'EBF1, qui limitera la différenciation aux lignages lymphocytaires B et T. Enfin, l'expression de Pax5 va inhiber les lignées lymphocytaires T et NK, et permettra l'expression du B220 (récepteur au CD45),

l'engagement définitif dans la lignée lymphocytaire B et la différenciation en pré-pro-B (Pour revue: Welinder et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Il est intéressant de noter qu'il existe une sous population de progéniteurs lymphoïdes communs particulière, capable de s'engager dans la lignée lymphocytaire B en absence d'IL7, mais pas de PU.1. Cette population, retrouvée dans le foie fœtal, est à l'origine des lymphocytes B1, sous classe particulière de cellules B jouant un rôle dans l'immunité innée (Pour revue : Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012).

2 Stade pré-pro-B : engagement définitif dans le lignage B

Le stade pré-pro-B constitue le stade le plus immature de la lignée lymphocytaire B. Ces cellules ne se distinguent de leurs progéniteurs que par l'expression de marqueurs spécifiques des cellules B. Ainsi, ces cellules expriment les marqueurs CD79a, CD79b et B220, caractéristiques des lymphocytes B. Toutefois, elles expriment encore le marqueur CD117 (c-kit) (Hardy et al., 2007).

L'expression prolongée de Pax5 et d'Ebfl est nécessaire pour engager définitivement la cellule dans la lignée lymphocytaire B, ces facteurs ayant à la fois pour rôle de favoriser l'expression de gènes B spécifiques, tout en réprimant celle de gènes associés aux lignées T et NK (Souabni et al., 2002; Treiber et al., 2010; Zandi et al., 2012). Il a en effet été démontré que l'arrêt de l'expression de Pax5 dans des pré-pro-B entraîne leur retour à l'état de progéniteurs multipotents, capables de se différencier en macrophages ou en lymphocytes T (Mikkola et al., 2002).

Sous l'influence de ces facteurs, les cellules vont acquérir l'expression du marqueur CD19, et atteindre le stade pro-B, auquel se dérouleront les réarrangements V_HDJ_H sur le locus des chaînes lourdes (Hardy et al., 2007).

3 Stade pro-B : réarrangement au locus IgH

Jusqu'à ce stade, les loci de chaînes d'immunoglobulines (Ig) sont en conformation germinale, et ne permettent donc pas l'expression d'Ig. Le passage au stade pro-B va être marqué par l'initiation des réarrangements V_HDJ_H , qui permettra la synthèse d'une chaîne

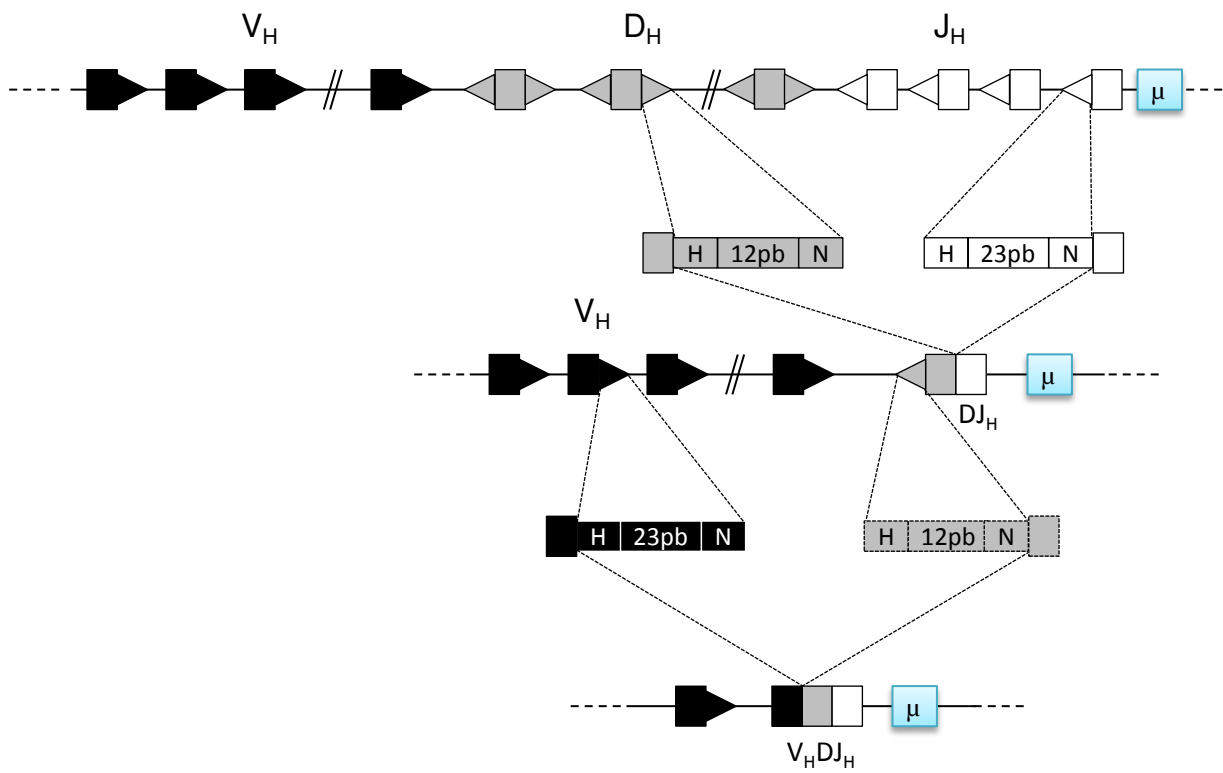


Figure 5 – Représentation schématique des RSS et de la règle « 12/23 ».

Les rectangles représentent les exons V_H , D , J_H et C_μ . Les triangles représentent les séquences RSS reconnues par les enzymes RAG lors des réarrangements VDJ.

lourde d'Ig. L'obtention d'un exon fonctionnel par un mécanisme de recombinaison est un mécanisme très particulier, qu'on ne retrouve que dans les lignées lymphocytaires. Son existence a été suggérée pour la première fois en 1965, par Dreyer et Bennet, qui évoquaient « *a kind of genetic scrambling process* » (Dreyer and Bennett, 1965). Il aura fallu plus de dix ans pour que plusieurs équipes parviennent à démontrer ce phénomène, et commencent à décrypter son fonctionnement (Hozumi and Tonegawa, 1976; Brack et al., 1978; Seidman et al., 1978; Weigert et al., 1978; Schilling et al., 1980; Early et al., 1980).

Les recombinaisons VDJ sont dites ordonnées (les réarrangements au locus IgL ne commencent qu'au stade pré-B, après la fin des réarrangements au locus IgH), et séquentielles (les recombinaisons D-J_H ont lieu avant les recombinaisons V_H-DJ_H). Les réarrangements D-J_H vont associer de manière aléatoire un segment D à un segment J_H, et ce sur les deux allèles simultanément. A l'opposé, les réarrangements V_H-DJ_H, qui associent aléatoirement un segment V_H au segment DJ_H préalablement formé, n'auront lieu que sur un allèle, suggérant une régulation plus stricte de ce deuxième réarrangement et un mécanisme d'exclusion allélique (Alt et al., 1984; Pour revue : Jung et al., 2006). Ceci a été confirmé par la découverte de réarrangement DJ_H, mais pas V_H-DJ_H dans des lymphocytes T (Kurosawa et al., 1981).

D'un point de vue mécanistique, les recombinaisons V(D)J peuvent être divisées en deux phases : l'induction de cassures doubles brins (DSB, pour Double Strand Break), et leur réparation. L'endonucléase RAG (Recombination-Activating Gene), formée des sous unités RAG1 et RAG2, est nécessaire *in vivo* (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992), et suffisante *in vitro* (van Gent et al., 1995; McBlane et al., 1995) pour induire ces cassures doubles brins.

Ces endonucléases vont cibler l'ADN spécifiquement sur des séquences signales localisées entre les segments, nommées RSS (Recombination Sequence Signal), à la structure très particulière (**Fig. 5**). Elles sont formées d'une séquence heptamérique (CACAGTG) et d'une nonamérique (ACAAAAACC), toutes deux hautement conservées au cours de l'évolution, et séparées par des séquences moins conservées de 12 ou 23 paires de bases nommées espaceurs (ou spacers). Les recombinaisons ne peuvent intervenir qu'entre des RSS contenant des spacers de tailles différentes, les segments V_H et J_H étant systématiquement encadrés par des RSS contenant des spacers de 23pb, tandis que celles encadrant les segments

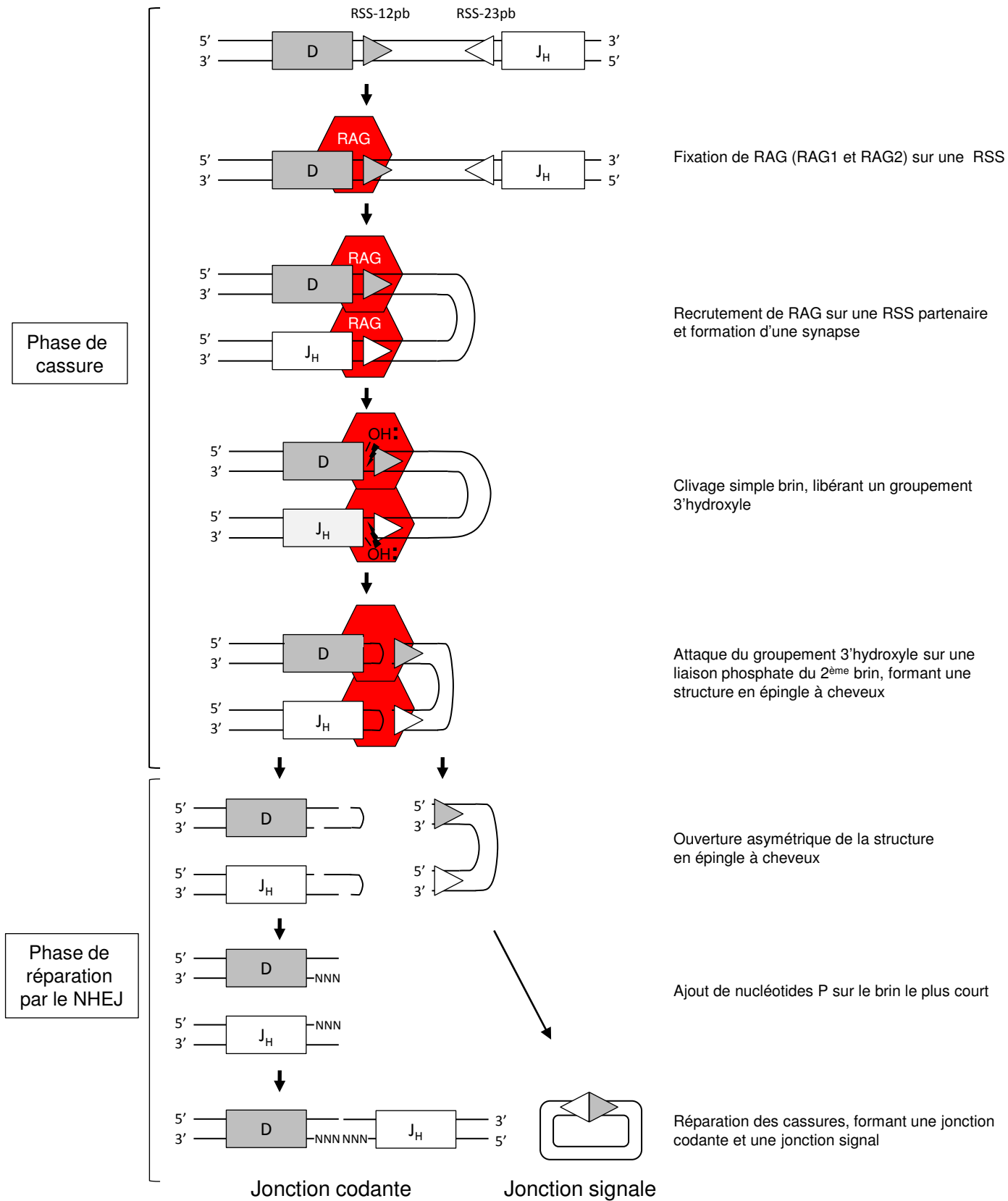


Figure 6 – Représentation schématique du processus de clivage de l'ADN par les enzymes RAG.
 Les rectangles gris et blancs représentent respectivement les exons JH et D. L'hexagone rouge représente le complexe RAG.

D contiennent des spacers de 12pb. Cette règle, dite « 12/23 », empêche la formation de jonctions V_HJ_H (Early et al., 1980; Eastman et al., 1996; Sawchuk et al., 1997).

Différentes études ont montré que le clivage de l'ADN suit un processus séquentiel (**Fig. 6**) : il commence par la reconnaissance et la fixation du complexe RAG sur une RSS, puis il y capture d'une RSS « partenaire » et formation d'une synapse entre deux segments (Jones and Gellert, 2002; Mundy et al., 2002). Des études plus récentes ont permis de préciser le déroulement de cette réaction. On sait ainsi que la fixation de RAG est suffisante pour induire un repliement de l'ADN, facilitant la formation d'une synapse en forme « d'épingle à cheveux » et l'induction de la cassure (Pavlicek et al., 2008). Enfin, il a été démontré *in vitro* que la formation d'une synapse stable précède obligatoirement l'induction de la cassure double brin, même si le caractère réversible de cette synapse reste encore controversé (Askary et al., 2014; Lovely et al., 2015).

Une fois la synapse en épingle à cheveux formée, la protéine RAG va induire une cassure simple brin entre le segment codant et la RSS, libérant un groupement 3'hydroxyle qui attaquera le second brin, provoquant une cassure double brin et formant deux types d'extrémités : une structure en épingle à cheveux aux extrémités des segments codant à joindre, et des extrémités franches au niveau des RSS (Schatz and Spanopoulou, 2005).

L'induction de cassures doubles brins au sein du génome constitue un évènement potentiellement dangereux, pouvant être à l'origine de translocations oncogéniques (Pour revue : Brandt and Roth, 2009). Pour limiter les risques, les cassures doivent être rapidement détectées, prises en charge et réparées. La première protection est assurée par les protéines RAG, qui restent fixées aux extrémités générées (McBlane et al., 1995) jusqu'à la détection des DSB par les senseurs de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour DSB Dependant Response) dépendante de la protéine ATM, ce qui permettra leur stabilisation et le recrutement de facteurs de réparation (Pour revue : Helmink and Sleckman, 2012). Enfin, la réparation des cassures sera assurée par la voie de réparation NHEJ (pour Non Homologous End Joining), qui mobilise plusieurs facteurs, dont notamment Ku70/Ku80, DNA-PKcs (DNA dependant Protein Kinase catalytic subunit), XRCC4 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 4), DNA ligase-IV, Artemis et Cernunnos (ou XLF pour XRCC4-like Factor) (Pour revue : Boboila et al., 2012).

Bien que mobilisant la même voie de réparation, les extrémités franches des RSS ne seront pas réparées de la même façon que les extrémités en épingle à cheveux des segments codants. Les extrémités franches vont être liées par jonction directe, sans modification de leur séquence, ce qui aboutira à la formation de jonctions signales, qui seront éliminées par la cellule. A l'opposé, les extrémités codantes vont subir des modifications avant la réparation. Une cassure asymétrique de la structure en épingle à cheveux va conduire à l'insertion de nucléotides sur le brin le plus court, homologues au brin opposé, provoquant l'apparition de courtes séquences palindromiques nommées nucléotides P (pour Palindromic Nucleotide). De plus, des nucléotides vont être introduits de manière aléatoire par l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidylTransferase) aux extrémités des régions codantes. On parle alors de N-diversité (Kurosawa et al., 1981; Sakano et al., 1981; Alt and Baltimore, 1982; Desiderio et al., 1984; Pour revue : Schatz and Spanopoulou, 2005).

Ces mécanismes assurent une grande diversité du répertoire antigénique. En effet, les séquences codant les CDR1 et 2 sont situées dans les segments V_H . Chaque segment V_H ayant une séquence différente, on obtient une première diversité dite « germinale ». Le troisième CDR est codé par la région de jonction entre les segments V_HDJ_H , la diversité des jonctions assurera donc un deuxième niveau de diversité, dit « somatique ». Enfin, la diversité de séquences des différents segments D et J_H , amplifiée par l'introduction de mutations au cours des réarrangements, ajoutera une diversité dite « combinatoire » (Jung et al., 2006).

Cette grande diversité du répertoire est nécessaire pour optimiser les réponses immunes, mais les mécanismes impliqués dans sa génération sont responsables de la formation fréquente de réarrangements V_HDJ_H non productifs. En effet, les réarrangements conduisent dans 2/3 des cas à un décalage du cadre de lecture du à l'insertion d'un nombre aléatoire de nucléotides, qui peuvent également provoquer l'apparition d'un codon stop. Il faut ajouter à cela la possibilité d'utilisation d'un segment V_H ou D non fonctionnel (Pour revue Mostoslavsky et al., 2004). En cas de réarrangement V_HDJ_H non productif, un autre réarrangement V_H-DJ_H aura lieu sur le deuxième allèle, ouvrant deux possibilités : soit le nouveau segment V_HDJ_H est fonctionnel, auquel cas la cellule continuera son développement, soit il ne l'est pas, et la cellule entrera alors en apoptose faute de pouvoir exprimer une chaîne lourde d'Ig. Une partie des lymphocytes B possèdera donc deux allèles IgH réarrangés. Il a été démontré que dans ce cas, les deux allèles sont exprimés tout au long du développement B. Les transcrits issus de l'allèle non productif seront alors pris en charge et dégradés par

différents mécanismes de surveillance des ARN, évitant ainsi la synthèse de chaînes lourdes tronquées potentiellement cytotoxiques (Daly et al., 2007; Tinguely et al., 2012).

Si un réarrangement productif a lieu, une chaîne lourde sera exprimée, et s'associera avec une pseudo chaîne légère formée par les protéines VpréB (CD179a) et $\lambda 5$ (CD179b), permettant l'expression d'un pré-BCR à la surface de la cellule (Sakaguchi and Melchers, 1986; Kudo and Melchers, 1987; Mårtensson et al., 2002). Cette expression à la membrane va marquer la transition vers le stade pré-B, d'une part en inhibant un éventuel réarrangement sur le deuxième allèle, s'il n'a pas déjà eu lieu, et d'autre part en induisant les réarrangements sur les locus de chaînes légères.

4 Stade pré-B : réarrangements au loci IgL

L'expression d'une chaîne lourde d'Ig, qui va s'associer à une pseudo chaîne légère et aux molécules co-stimulatrices CD79a et CD79b pour former un pré-BCR, constitue le premier point de contrôle lors du développement B. Cela permet d'assurer que la cellule exprime une chaîne lourde unique, avant d'initier les recombinaisons sur les chaînes légères (Pour revue : Mårtensson et al., 2010).

Les cellules pré-B sont séparées en deux sous populations. On distingue les grandes cellules pré-B (ou large pre-B) caractérisées par l'expression du CD43 et l'absence de CD25. Ces cellules vont subir 2 à 5 cycles de divisions (Rolink et al., 2000), avant de devenir des petites cellules pré-B (small pre-B), exprimant le CD25 mais plus le CD43. Ces cellules ne se divisent plus, mais vont subir les réarrangements sur les chaînes légères. Il est nécessaire que les phénomènes de prolifération et de recombinaison soient exclusifs, afin d'assurer la stabilité du génome. Cet équilibre est assuré par la balance entre la voie du récepteur à l'IL7 et la voie du pré-BCR (Clark et al., 2014). Au stade large pre-B, l'activation du pre-BCR va activer la voie de la PI3K via la protéine SYK, ce qui aura pour conséquence la phosphorylation et la dégradation des protéines FOXO, induisant la prolifération et la sous expression des protéines RAG. Lors de la transition vers le stade small pre-B, SYK va activer la protéine SLP65 qui va réprimer la signalisation du pre-BCR via la PI3K, conduisant à l'arrêt de la dégradation des protéines FOXO, et donc à l'arrêt de la prolifération et à la réexpression des protéines RAG (Herzog et al., 2008, 2009; Pour revue : Reth and Nielsen,

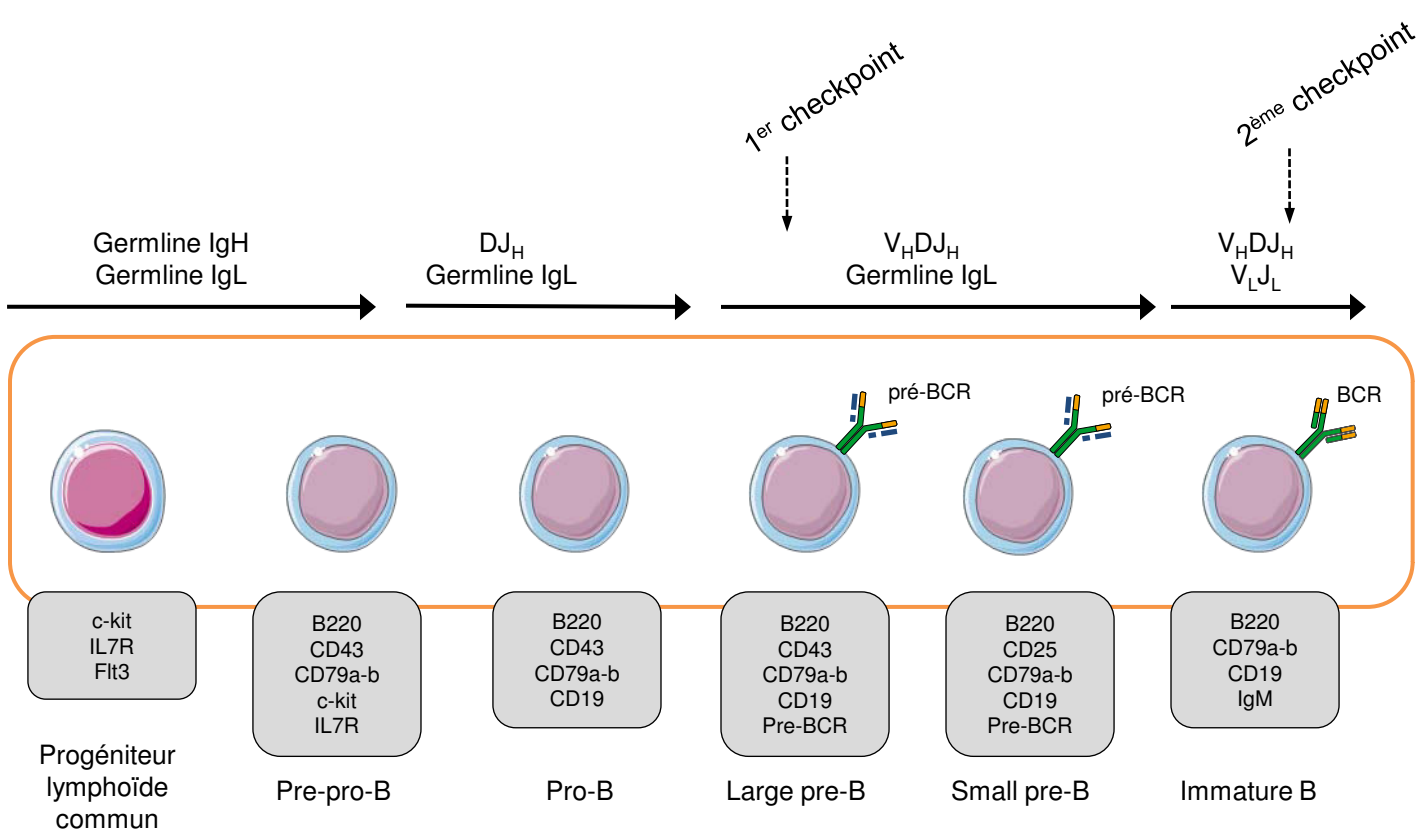


Figure 7 – Représentation schématique de l'ontogénie B précoce.

Les encadrés gris indiquent les principaux facteurs de transcriptions et marqueurs de surface exprimés aux différents stades. Les flèches horizontales représentent l'évolution de la configuration des loci d'Ig, les flèches verticales représentent les deux « checkpoints » du développement B précoce.

2014). Cette répression de la signalisation par le pré-BCR est amplifiée par un mécanisme de rétrocontrôle négatif : la signalisation par le pré-BCR va induire l'expression de la protéine LAPTM5 (lysosome associated protein transmembrane 5) qui va provoquer la dégradation dans les lysosomes du pré-BCR intracellulaire, limitant son expression à la membrane (Kawano et al., 2012). L'inhibition de la signalisation via le pré-BCR va entraîner l'arrêt de la prolifération dans les cellules et le déclenchement des réarrangements sur les loci de chaînes légères.

Les recombinaisons sur les chaînes légères impliquent sensiblement les mêmes mécanismes que les recombinaisons sur les chaînes lourdes, la différence principale étant l'absence d'expression de la TdT qui empêche l'apparition de N-diversité. Ces recombinaisons sont ordonnées, et affectent en premier le locus $Ig\kappa$, puis le locus $Ig\lambda$, ce qui explique la plus grande fréquence de cellules $Ig\kappa^+$ chez la souris (Engel et al., 1999). Il existe comme pour les chaînes lourdes un mécanisme d'exclusion allélique. En effet, la formation d'un segment V_LJ_L fonctionnel va entraîner l'arrêt des recombinaisons sur les autres allèles. On parle d'exclusion allélique pour l'arrêt des recombinaisons sur le deuxième allèle $Ig\kappa$ après formation d'un exon $V\kappa J\kappa$ fonctionnel, et d'exclusion isotypique pour le blocage des recombinaisons sur le locus $Ig\lambda$ (Mostoslavsky et al., 2004; Jung et al., 2006). Il est intéressant de noter que la réexpression des protéines RAG n'induit pas de réarrangement V_H-DJ_H sur le deuxième allèle IgH non réarrangé, l'activité de ces protéines étant limitée aux loci d' IgL lors du stade pré-B (Constantinescu and Schlissel, 1997; Pour revue : Jung et al., 2006).

La formation d'un exon V_LJ_L productif va permettre la synthèse d'une IgL fonctionnelle qui sera associée à la chaîne lourde déjà présente, permettant la formation d'une IgM complète. Elle sera exportée à la membrane où elle formera un BCR en s'associant avec le complexe CD79a/CD79b. L'expression d'un BCR caractérise le passage au stade B immature.

5 Stade B immature : tolérance et édition du BCR

A ce stade, à l'issue des différentes étapes de maturation, les cellules expriment un BCR fonctionnel et perdent l'expression du CD25 (**Fig. 7**). Toutefois, l'expression d'un BCR n'est pas suffisante pour permettre le passage des cellules B en périphérie : elles doivent d'abord

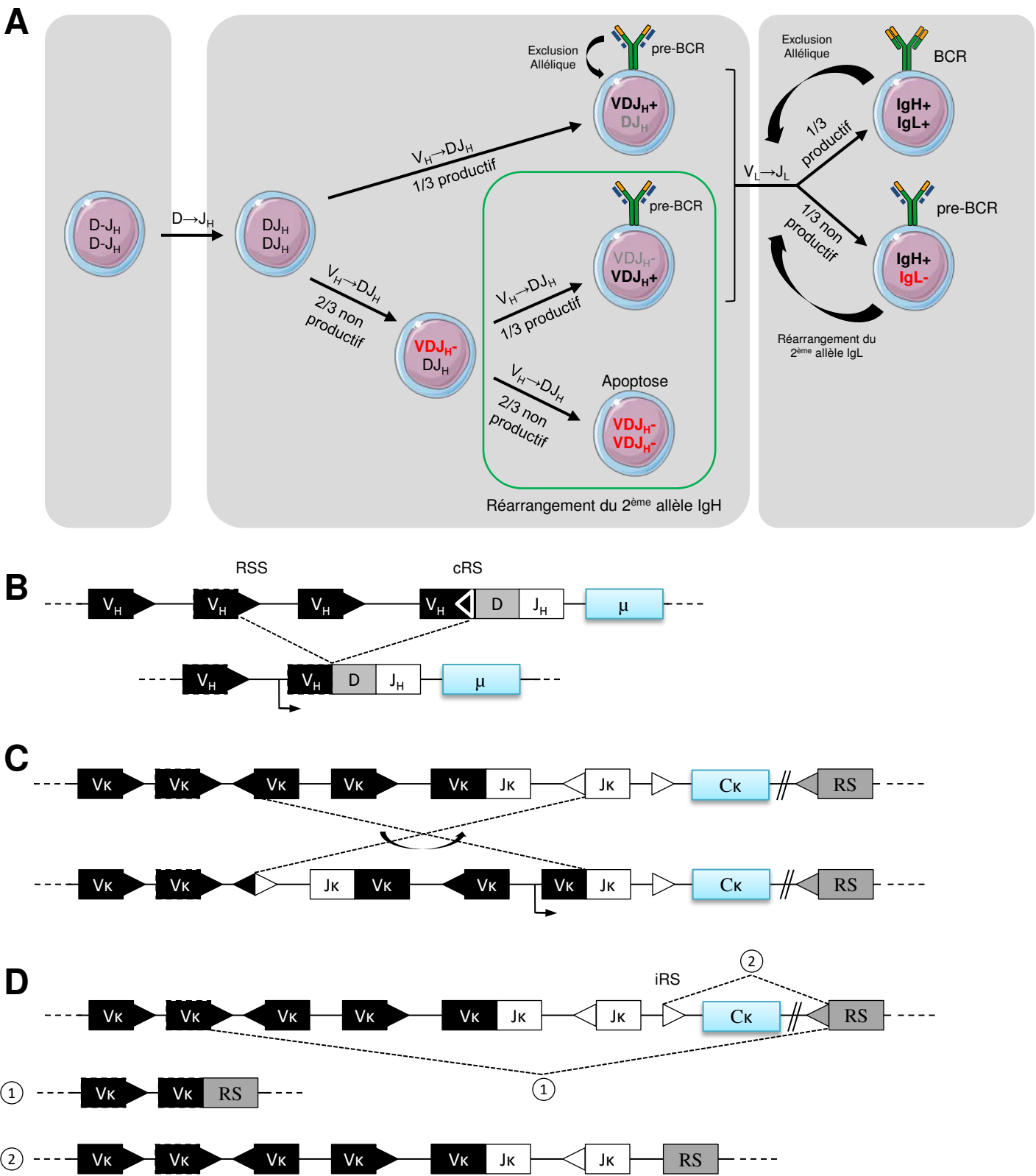


Figure 8 – Etat des réarrangements V(D)J et édition du BCR.
(A) Statut du BCR et pourcentage de réarrangements V(D)J productifs. Si le BCR formé est autoréactif, l'édition du BCR est initiée. Elle permet de modifier l'exon réarrangé sur le locus IgH **(B)** ou Igk **(C)**, ou d'inactiver ce dernier **(D)**, ce qui aura pour effet d'initier les réarrangements sur le locus Igλ. Les rectangles représentent les exons, les triangles les séquences RSS ou cRS

subir un nouveau contrôle afin d'éliminer les cellules exprimant un BCR autoréactif, c'est-à-dire reconnaissant un antigène du soi. Ce deuxième « checkpoint » permet d'assurer la tolérance immunitaire, c'est à dire la capacité de l'organisme à supporter la présence d'antigène sans déclencher de réaction immunitaire. Pour cela, un mécanisme de sélection négative va permettre d'éliminer les cellules exprimant un BCR autoréactif par apoptose, ou de les rendre anergiques (Pike et al., 1982; Russell et al., 1991).

Pour échapper à l'apoptose, les cellules peuvent modifier leur BCR, en réalisant de nouveaux réarrangements aux niveaux de leurs loci d'Ig : on parle d'édition du BCR (**Fig. 8**) (Tiegs et al., 1993; Halverson et al., 2004). Sur le locus $Ig\kappa$, ces réarrangements peuvent facilement avoir lieu entre un segment $V\kappa$ en amont de l'exon $V\kappa J\kappa$ et un segment $J\kappa$ en aval. Le locus peut également subir des recombinaisons entre un segment $V\kappa$ et une séquence nommée RS, située en aval du $C\kappa$, ce qui conduit à l'inactivation du locus et au déclenchement des recombinaisons sur le locus $Ig\lambda$ (Moore et al., 1985; Luning Prak et al., 2011). Sur le locus des chaînes lourdes, le mécanisme d'édition est sensiblement différent des réarrangements $V_H D J_H$ initiaux. En effet, ces derniers, en éliminant l'intégralité des segments D autres que celui compris dans l'exon productifs, empêchent la survenue d'autres recombinaisons en accord avec la règle 12/23. Malgré ça, des réarrangements peuvent avoir lieu, entre la séquence RSS d'un segment V_H situé en amont et une séquence heptamérique, nommée (cRS pour Cryptic RS), située en 3' de la plupart des segments V_H (Covey et al., 1990; Pour revue : Jung et al., 2006; Luning Prak et al., 2011). Ces séquences cRS sont, au même titre que les RSS, particulièrement conservées au cours de l'évolution, ce qui témoigne de leur importance dans le cadre de la tolérance immunitaire (Zhang et al., 2004).

A l'issu de ce point de contrôle, et après une éventuelle édition du récepteur, les cellules ne reconnaissant pas d'antigène du soi pourront continuer leur développement, et quitteront la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

III) Phases tardives dépendantes de l'antigène

1 Stade transitionnel et "*B cell fate*"

1.a Stade transitionnel

Lorsqu'elles sortent de la moelle osseuse, les cellules empruntent la circulation sanguine pour arriver jusqu'à la rate. Cependant, ces cellules ne sont pas encore matures, et n'ont pas la capacité à répondre à une stimulation par un antigène. Ces fonctions seront acquises progressivement, au cours du stade dit « transitionnel » (Pour revue : Chung et al., 2003). Ce stade correspond à une population de cellules hétérogènes, divisée en trois sous-populations : T1, T2 et T3, possédant chacune des marqueurs de surface et des fonctions spécifiques. De façon schématique, les T1 correspondent aux cellules transitionnelles précoces, et les T2 correspondent aux tardives. Les T3, décrites plus récemment, constituent une population distincte de cellules anergiques et fréquemment autoréactives (Merrell et al., 2006; Teague et al., 2007; Liubchenko et al., 2012).

La différence principale entre les T1 et T2 est leur réponse à une stimulation du BCR. En effet, au stade T1, la fixation d'un antigène au BCR induit l'entrée en apoptose de la cellule. Il s'agit donc d'une sélection supplémentaire, dans la continuité du *checkpoint* se déroulant au stade immature dans la moelle osseuse. Toutefois, les cellules transitionnelles n'exprimant plus les enzymes du complexe RAG, la reconnaissance d'un antigène du soi ne pourra pas induire l'édition du BCR, et provoquera donc l'entrée en apoptose de la cellule ou son anergie (Sandel and Monroe, 1999). Plusieurs études ont démontré l'importance de cette sélection dans les cellules transitionnelles, en montrant qu'une dérégulation à ce stade est fréquemment associée à des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux ou le syndrome de Sjodren (Teague et al., 2007; Pour revue : Vossenkämper et al., 2012).

Au stade T2, les cellules vont progressivement acquérir les caractéristiques de cellules B matures. Même si les différentes sources bibliographiques divergent sensiblement, probablement à cause de différences dans les protocoles d'isolation des différentes sous-populations transitionnelles, il est admis que le stade T2 est marqué par l'augmentation progressive de la résistance à l'apoptose et de la capacité de prolifération en réponse à une stimulation via le BCR.

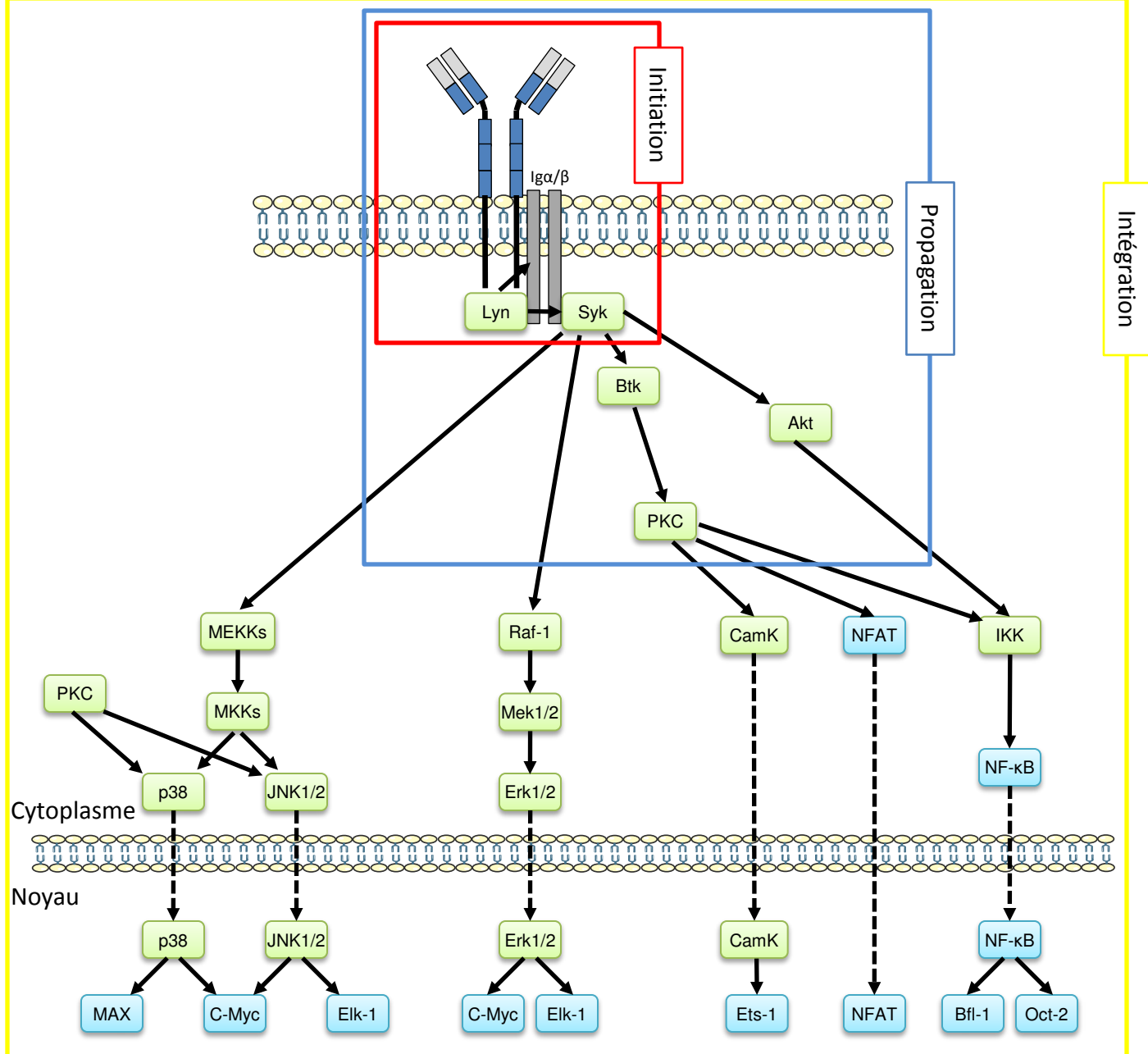


Figure 9 – Représentation schématique simplifiée de la voie de signalisation du BCR.

La fixation d'un antigène au BCR entraîne son activation et l'induction d'une cascade de signalisation divisée en trois parties : l'initiation, la propagation et l'intégration.

Adapté d'après Dal Porto et al., 2013

C'est la mise en place des cascades de signalisation en amont du BCR qui va réguler la poursuite du développement lymphocytaire jusqu'au stade mature, en association notamment avec la voie du récepteur au BAFF (B-cell Activating Factor, aussi appelé BLys) (Schneider et al., 1999; Sasaki et al., 2004; Pour revue : Cancro, 2004; Jung et al., 2006; Khan, 2009). Parallèlement à la mise en place de ces signalisations, le BCR va acquérir au stade mature la capacité à répondre à une stimulation en se relocalisant au sein de rafts lipidiques et en surexprimant le CD86, une protéine costimulatrice, formant ainsi un « signalosome » permettant d'optimiser la transduction du signal BCR (Chung et al., 2001, 2002).

1.b Signalisation et *B cell fate*

La capacité des lymphocytes B à répondre à des signaux, acquise au cours du stade transitionnel, va avoir deux fonctions : d'une part assurer la survie et la continuité du développement des cellules ayant passé avec succès les différents points de contrôle au cours de la lymphopoïèse précoce, et d'autre part réguler le devenir des cellules au stade mature. En effet, les cellules B matures sont divisées en plusieurs sous populations, possédant chacune des caractéristiques et des fonctions différentes. Les deux sous-populations majeures sont les cellules dites de la zone marginale (MZ B cells, pour Marginale zone B cells) et les cellules folliculaires (FO) (Pillai and Cariappa, 2009). On distingue également une population de cellules dites « B1 », issues de précurseurs différents (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012).

L'importance de ces signaux a été démontrée par de nombreuses études reposant sur l'altération des cascades de signalisation en réponse à l'activation du BCR. Selon les protéines ciblées, une perturbation de cette signalisation peut entraîner un blocage au stade transitionnel, ou un biais dans la répartition des sous populations marginales et folliculaires (Chung et al., 2003; Allman et al., 2004).

L'activation de la signalisation par le BCR peut être divisée en 3 étapes : 1 – l'initiation de la signalisation par la fixation d'un antigène sur le récepteur, 2 – la propagation du signal et l'activation de cascades de phosphorylation via des seconds messagers, et 3 – l'intégration du signal, conduisant à l'activation et à la translocation au noyau de facteurs de transcription favorisant la survie et la différenciation des cellules B (**Fig. 9**) (Pour revue : Dal Porto et al., 2004; Packard and Cambier, 2013). En parallèle de la voie du BCR, la fixation

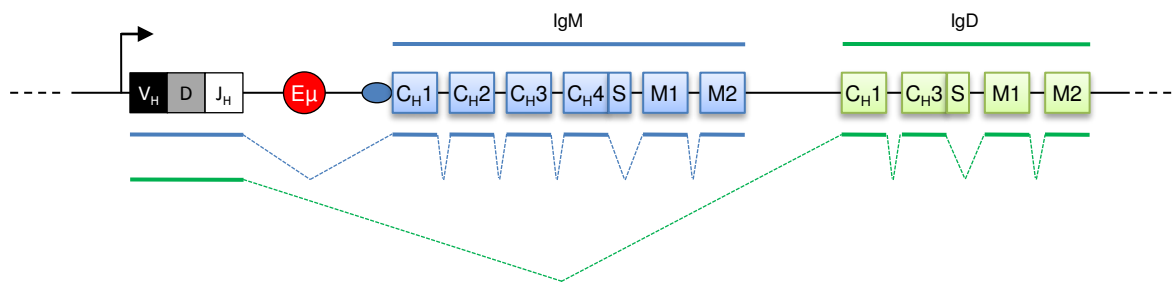
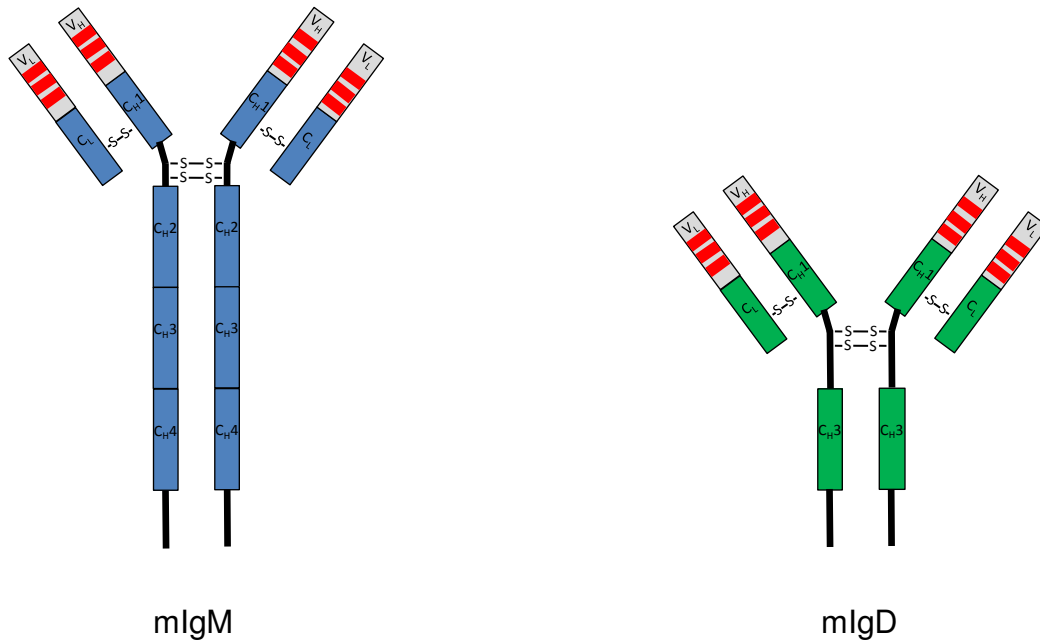
A**B**

Figure 10 – Mécanisme d'épissage alternatif permettant l'expression simultanée d'IgM et IgD.

- (A) Les lignes bleues et vertes représentent les transcrits permettant respectivement la synthèse d'IgM et d'IgD. Les traits pleins représentent les exons conservés après épissage.
- (B) L'IgM contient 4 domaines C_H, tandis que l'IgD n'en contient que deux (le deuxième étant quand même noté C_H3) et possède une région charnière plus longue.

des protéines BAFF et APRIL, des ligands de la famille du TNF, à leurs récepteurs (BAFF-R et TACI pour le BAFF, BCMA et TACI pour APRIL), vont favoriser la différenciation et la survie des cellules B en activant les voies canoniques et alternatives de NF- κ B (Pour revue : Chung et al., 2003; Pillai and Cariappa, 2009; Pieper et al., 2013).

Les cellules B expriment également depuis les stades précoces de leur développement des récepteurs, les TLR (Toll Like Receptors), capables de reconnaître des motifs spécifiques des pathogènes tels que des lipopolysaccharides ou des séquences particulières d'ADN, regroupés sous le nom de PAMP (pour Pathogen Associated Molecular Patterns). Des études ont montré que l'activation de ces TLR au cours du stade transitionnel influence le devenir des cellules, et peut entraîner leur différenciation en cellules plasmatisques (Capolunghi et al., 2008) ou en cellules B mémoires (Aranburu et al., 2010).

L'équilibre entre l'activation de ces différentes voies va affecter le devenir des cellules B (aussi appelé « B cell fate »). L'hypothèse la plus généralement admise est qu'une signalisation forte par le BCR va induire une différenciation en B folliculaire, tandis qu'un signal BCR faible favorisera une différenciation en B de la zone marginale. Certaines études tendent cependant à nuancer cette théorie, et suggèrent une régulation plus fine du *B cell fate*. En effet, la plupart des modèles utilisés pour étudier l'impact de la signalisation *via* le BCR sur la différenciation consiste à éliminer ou altérer des protéines impliquées dans les cascades de signalisation induite par le BCR, afin de moduler l'intensité de ce signal. Le défaut principal de ces modèles est que la signalisation est perturbée dès les stades les plus précoces de la lymphopoïèse, bien avant la différenciation en B MZ ou FO. Il a été suggéré que de telles mutations puissent perturber la mise en place du répertoire antigénique, notamment en affectant la sélection négative et/ou positive des clones, et favorisant ainsi le maintien de cellules autoréactives, ce qui perturberait la répartition des cellules B MZ et FO (Pour revue : Martin and Kearney, 2002; Allman et al., 2004; Pillai and Cariappa, 2009).

1.c IgD

A partir du stade T2, les cellules vont exprimer à la membrane un BCR à IgD, en plus de l'IgM acquis lors des stades précoces, grâce à un mécanisme d'épissage alternatif d'un grand transcrit commun (**Fig. 10**), (Rowe et al., 1973; Moore et al., 1981; Mountz et al., 1990; Pour revue : Chen and Cerutti, 2011). Cette double expression reste un mécanisme

énigmatique : les BCR IgM et IgD activant des voies de signalisations relativement similaires lors d'une stimulation, quel est l'intérêt d'exprimer ces deux isotypes simultanément ? L'importance de cette co-expression a longtemps été sous estimée, d'une part parce que les premières études semblaient indiquer qu'un de ces deux isotypes pouvait compenser la délétion de l'autre dans des modèles murins (Roes and Rajewsky, 1991; Nitschke et al., 1993; Lutz et al., 1998), et d'autre part parce que l'IgD a longtemps été perçu comme un isotype peu conservé et apparu récemment dans l'évolution (Preud'homme et al., 2000). Ces deux affirmations ont été depuis nuancées par des études plus fines.

En effet, la délétion de C μ modifie le répertoire antigénique, notamment en altérant le choix des segments V $_H$ utilisés lors des recombinaisons VDJ, et perturbe la mémoire immunitaire et les réponses secondaires à une infection (Guo et al., 2008; Han et al., 2004). D'autre part, l'étude de souris déficientes pour IgD a montré une perturbation de la lymphopoïèse et une mise en place retardée du phénomène d'hypermutation somatique lors de réactions T-dépendantes, ce qui suggère un rôle du BCR IgD pour accélérer la réaction du lymphocyte B lors des premières phases d'une réaction immunitaire (Roes and Rajewsky, 1993).

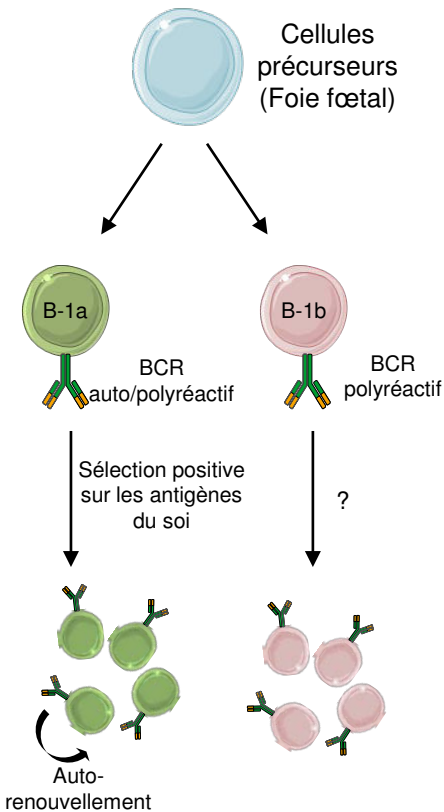
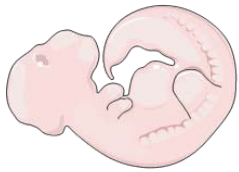
D'un point de vue évolutif, les progrès en matière de séquençage et d'analyse de génome ont démontré que, contrairement à ce qui était admis, l'IgD est un isotype ancien, conservé chez la plupart des vertébrés (à l'exception des oiseaux et de quelques mammifères) depuis les élasmobranches (les plus anciens vertébrés à mâchoires). On retrouve chez tous ces organismes un mécanisme d'épissage alternatif et une double expression IgM/IgD (Ohta and Flajnik, 2006; Zhu et al., 2014). Une étude récente a permis d'identifier une protéine, Zfp318 (pour Zinc Finger Protein 318), très conservée dans l'évolution et responsable de l'épissage alternatif du transcrit IgM/IgD. La délétion de cette protéine entraîne une disparition quasi-totale de l'IgD, sans affecter l'expression d'autres gènes (Enders et al., 2014; Pioli et al., 2014). La conservation et la spécificité de la protéine Zfp318 confirme l'importance de cette double expression contrôlée d'un BCR IgM et IgD.

L'hypothèse qui prévaut actuellement est que le BCR IgD aurait un rôle de modulateur de la réponse immune, régulant la sélection et l'homéostasie des lymphocytes B. Ainsi, au stade transitionnel, l'augmentation de l'expression du BCR IgD permettrait d'amplifier le signal du BCR IgM, facilitant la sélection des clones positifs et le passage au stade mature (Carsetti et al., 1993, 1995; Pour revue : Geisberger et al., 2006). Cependant, d'autres données

suggèrent que le BCR IgD transmettrait des signaux répresseurs ou apoptotiques. En effet, l'expression conjointe d'un BCR IgD et de son antigène à la membrane d'une cellule va entraîner un blocage du développement au stade immature (Duong et al., 2010). D'autre part, il a été démontré que les cellules matures anergiques murines expriment plus d'IgD que d'IgM, tandis que des études chez l'homme ont montré que les cellules exprimant plus d'IgD que d'IgM ne répondent que très peu aux stimulations par le BCR (Goodnow et al., 1988; Zheng et al., 2004; Koelsch et al., 2007; Duty et al., 2009; Chen and Cerutti, 2011). L'importance de ce rôle du BCR IgD dans la tolérance immunitaire est confirmée par l'augmentation de la synthèse d'auto-anticorps dans des souris *lpr* (modèle murin fréquemment utilisé pour étudier les maladies auto-immunes, notamment le lupus) déficientes pour IgD (Guo et al., 2011c).

Ces différences de signalisation entre les BCR IgM et IgD peuvent également être expliquées par des différences dans la structure de ces immunoglobulines, et notamment de leur région charnière. En effet, la région charnière de l'IgD est particulièrement flexible, ce qui influence sa capacité à fixer les antigènes (Løset et al., 2004; Übelhart et al., 2015). Ainsi, une étude récente a montré qu'un antigène à faible valence (possédant peu d'épitopes où l'Ig peut se fixer) induira une signalisation via le BCR IgM uniquement, tandis qu'un antigène polyvalent activera les deux isotypes (Übelhart et al., 2015). Les auteurs suggèrent que cette différence favorise la tolérance. Les antigènes du soi sont majoritairement présents sous forme soluble et n'activeront que les BCR IgM, générant un signal insuffisant pour activer le lymphocyte B. Inversement, les antigènes du non soi sont majoritairement rencontrés sous forme polymérique au sein de complexes immuns ou liés à des cellules présentatrices d'antigène, et permettront l'activation simultanée des BCR IgM et IgD, générant ainsi un signal suffisant pour activer le lymphocyte B. Il a été démontré que la formation de clusters de BCR reconnaissant des antigènes multimériques induit une signalisation plus rapide qu'un BCR seul (Mukherjee et al., 2013). Sachant qu'environ 30% des cellules B matures possèdent une part d'autoréactivité et que ces cellules sont caractérisées par une baisse de l'IgM de membrane, mais pas de l'IgD (Zikherman et al., 2012), un modèle a été suggéré : l'expression de l'IgM de membrane, capable de reconnaître des auto-antigènes solubles est diminuée, tandis que l'IgD, qui ne reconnaîtra les antigènes que sous forme multimérique, sera exprimée fortement. Ceci permet de limiter les risques de réaction auto-immune, tout en assurant la

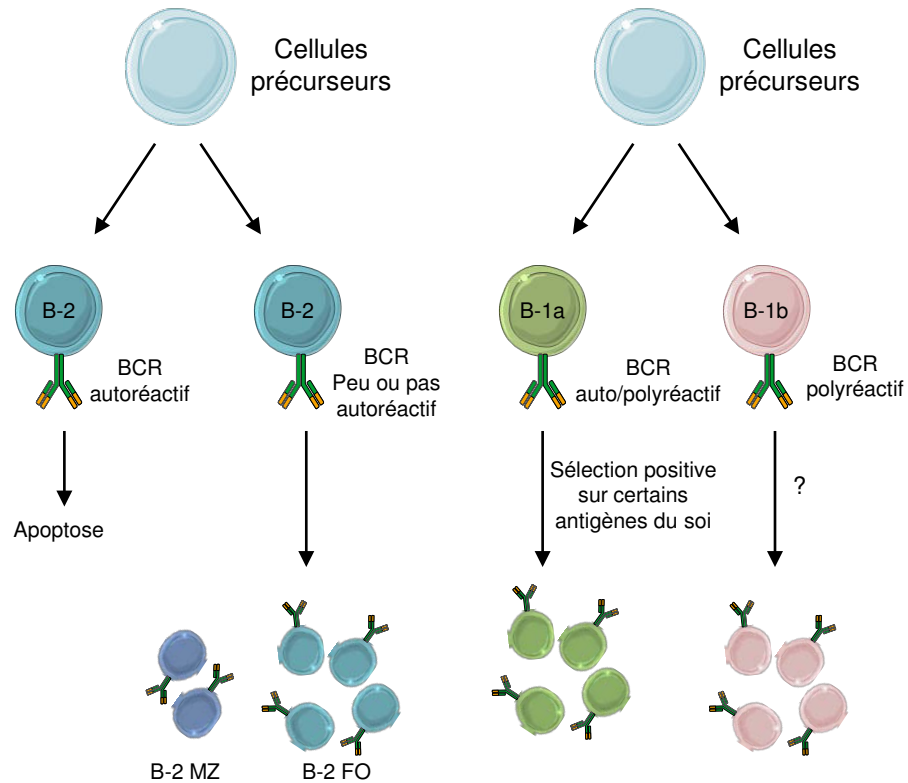
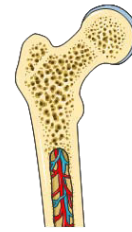
Hématopoïèse foetale



Lymphocytes B-1 issus du foie fœtal

- Usage majoritaire de certains segments V_H
- Diversité combinatoire limitée
- Maintien du pool par auto-renouvellement

Hématopoïèse chez l'adulte



Lymphocytes B-2 périphériques :

- Pas de BCR autoréactifs
- Renouvellement continu à partir de la moelle osseuse

Lymphocytes B-1 chez l'adulte:

- Plus grande diversité du répertoire
- Contribution mineure au pool de B-1 en conditions normales
- Capables de régénérer le pool de B-1 après déplétion

Figure 11 – Représentation schématique du développement des lymphocytes B-1.

Les lymphocytes B-1 sont sélectionnés différemment selon qu'ils proviennent du foie fœtal (gauche de la figure) ou de la moëlle osseuse lors de l'hématopoïèse chez l'adulte. Adapté d'après Baumgarth, 2011

reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B (Zikherman et al., 2012; Übelhart et al., 2015).

Il est également intéressant de noter que l'IgD membranaire n'est pas retrouvée exclusivement sous forme de BCR : une fraction est reliée à la membrane par une ancre GPI. Ces IgD membranaires sont localisées dans les rafts lipidiques de façon constitutive et sont, contrairement au BCR, capables de mobiliser les voies de signalisation de l'AMPc (Wienands and Reth, 1992; Chaturvedi et al., 2002). De plus, l'IgD est capable de se fixer efficacement à certaines protéines bactériennes, non pas par sa partie variable, mais par des résidus glucidiques localisés sur la partie constante. Cette fixation, même si elle est indépendante de la partie variable de l'Ig, est suffisante pour induire l'activation des cellules B (Ruan et al., 1990; Forsgren et al., 2001).

Bien que certains points restent à éclaircir, l'IgD co-exprimée avec l'IgM semble donc avoir un rôle de régulateur, permettant grâce à ses propriétés particulières de moduler finement la signalisation *via* les BCR.

2 Stade B mature et formation du GC

Les lymphocytes B matures naïfs, c'est-à-dire avant leur rencontre avec l'antigène, sont divisés en 3 sous populations qui diffèrent par leur origine, leurs fonctions, leurs localisations au sein des organes lymphoïdes secondaires et leurs marqueurs de surface. On distingue les B marginaux et folliculaires, mentionnés précédemment, qui forment la population des lymphocytes B2, et les lymphocytes B1.

2.a Les lymphocytes B1

Les lymphocytes B1 constituent une population à part au sein de la lignée lymphocytaire B, assimilée à l'immunité innée. On distingue deux sous populations B1 : les B1a (CD5⁺) et les B1b (CD5⁻) (**Fig. 11**). Les B1 ne suivent pas les voies de développement des lymphocytes B2 « conventionnels », et leur origine a longtemps été sujette à controverse. On distingue deux théories principales : le modèle de sélection, qui suggère que la différenciation en B1 ou en B2 dépend de l'antigène reconnu par le BCR (Haughton et al.,

1993), ou le modèle de développement « en couche » (« *layered immune system* »), qui évoque des précurseurs différents à l'origine des deux sous populations (Herzenberg and Herzenberg, 1989). Il est aujourd'hui admis, grâce à différentes études basées sur des transferts de cellules B plus ou moins matures dans des souris irradiées, que les cellules B1 sont issues de précurseurs différents des B2, la divergence entre les deux lignées apparaissant dès le stade précurseurs lymphoïdes précoces. En effet, le transfert de cellules pro-B dans des souris irradiées ne donnera que des cellules B2, tandis que le transfert de CLP permettra de reconstituer les deux sous populations (Esplin et al., 2009). Une étude in vitro a permis de démontrer que parmi les CLP, chaque clone ne donnera que des B1 ou des B2, mais jamais les deux, ce qui montre que la séparation des deux lignées apparaît avant la transition ELP-CLP (Barber et al., 2011). La même étude a également démontré que les CLP de nouveau-nés donnent plus fréquemment des B1 que des CLP d'adultes, ce qui explique l'origine majoritairement fœtale des B1 (Pour revue : Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007; Baumgarth, 2011).

Les lymphocytes B1 sont la population B majoritaire dans le péritoine. On en retrouve également dans la rate, la moelle osseuse et le sang. Ils expriment un répertoire antigénique particulier, marqué par une utilisation préférentielle de certains segments V_H et un très faible taux d'insertion aléatoire de nucléotides au cours des recombinaisons VDJ (Kantor, 1996; Kantor et al., 1997). La majorité des B1 exprime des Ig polyréactives, reconnaissant à la fois des antigènes du soi, notamment exprimés par les cellules apoptotiques tels que la phosphatidylcholine, et des antigènes caractéristiques de certains pathogènes (Kulik et al., 2009; Racine and Winslow, 2009). Cette présence de BCR auto-réactifs est, de façon surprenante, due à un mécanisme de sélection positive : la signalisation via un BCR auto-réactif est un pré requis à la différenciation en B1 (Hayakawa et al., 1999; Hardy and Hayakawa, 2012).

Les B1 sont responsables de la sécrétion des Ig dit « naturels » (ou NIg), majoritairement des IgM et dans une moindre mesure des IgA. Ces Ig poly-réactifs ont un double rôle. Ils constituent une première ligne de défense contre les pathogènes. Malgré leur faible affinité, leur fixation permet de ralentir la réplication de pathogènes le temps que la réponse adaptative se mette en place (Martin et al., 2001). D'autre part, ils assurent un rôle de « nettoyage » de l'organisme : leur fixation grâce à leur faible auto-réactivité sur les débris de cellules apoptotiques favorise leur élimination, limitant ainsi l'inflammation et le risque

d'apparition d'auto-anticorps monoclonaux dirigés contre ces anticorps du soi. L'importance de ce rôle a été mise en évidence dans des modèles de souris susceptibles de déclencher des maladies auto-immunes, dans lesquelles la suppression des B1 entraîne une aggravation des pathologies (Boes et al., 2000). Un rôle de ces NIg serait également de limiter le développement de l'athérosclérose, en reconnaissant les lipoprotéines de basse densité oxydées contribuant au développement de cette pathologie (Shaw et al., 2000; Hartvigsen et al., 2009). Enfin, les NIgA, qui représentent une part significative des Ig secrétées dans le tube digestif, semblent avoir une fonction dans la régulation de la flore commensale (Kroese et al., 1996; Macpherson and Slack, 2007).

Les lymphocytes B1, cellules à l'interface de l'immunité innée et adaptative, jouent donc un rôle crucial, d'une part en assurant une première ligne de défense contre les pathogènes, et d'autre part en assurant une « maintenance » de l'organisme nécessaire pour limiter les risques de pathologies auto-immunes (Pour revue : Baumgarth, 2011).

2.b Lymphocytes B de la zone marginale

Les lymphocytes B MZ représentent une sous population des lymphocytes B2. Comme leur nom l'indique, ils sont majoritairement localisés à la périphérie de la rate, qui représente l'interface entre les systèmes sanguins et immunitaires. Plus précisément, ils sont situés à proximité des sinus marginaux qui constituent une zone de moindre résistance à l'écoulement du flux sanguin par rapport aux artères qui irriguent la rate, ce qui facilite l'entrée dans la zone marginale des pathogènes transportés par le sang (Mebius and Kraal, 2005; Cerutti et al., 2013).

Malgré leurs différences de localisation dans l'organisme, d'origine et de marqueurs de surface, les B MZ possèdent des fonctions similaires aux B1. En effet, leurs gènes d'Ig sont majoritairement non mutés, et leur BCR sont fréquemment polyréactifs et/ou faiblement autoréactifs. Ils sont ainsi capables de reconnaître à la fois des motifs communs à certains pathogènes (les PAMP) ou des débris de cellules apoptotiques (DAMP) (Martin and Kearney, 2002; Pillai and Cariappa, 2009). Cette particularité du BCR est associée à une forte expression de récepteurs, les TLR (Toll Like Receptor), capables de reconnaître des molécules d'origine bactériennes telles que les lipopolysaccharides (LPS) ou encore certaines séquences d'ADN (CpG) (Genestier et al., 2007; Rubtsov et al., 2008).

Lymphocyte B activé

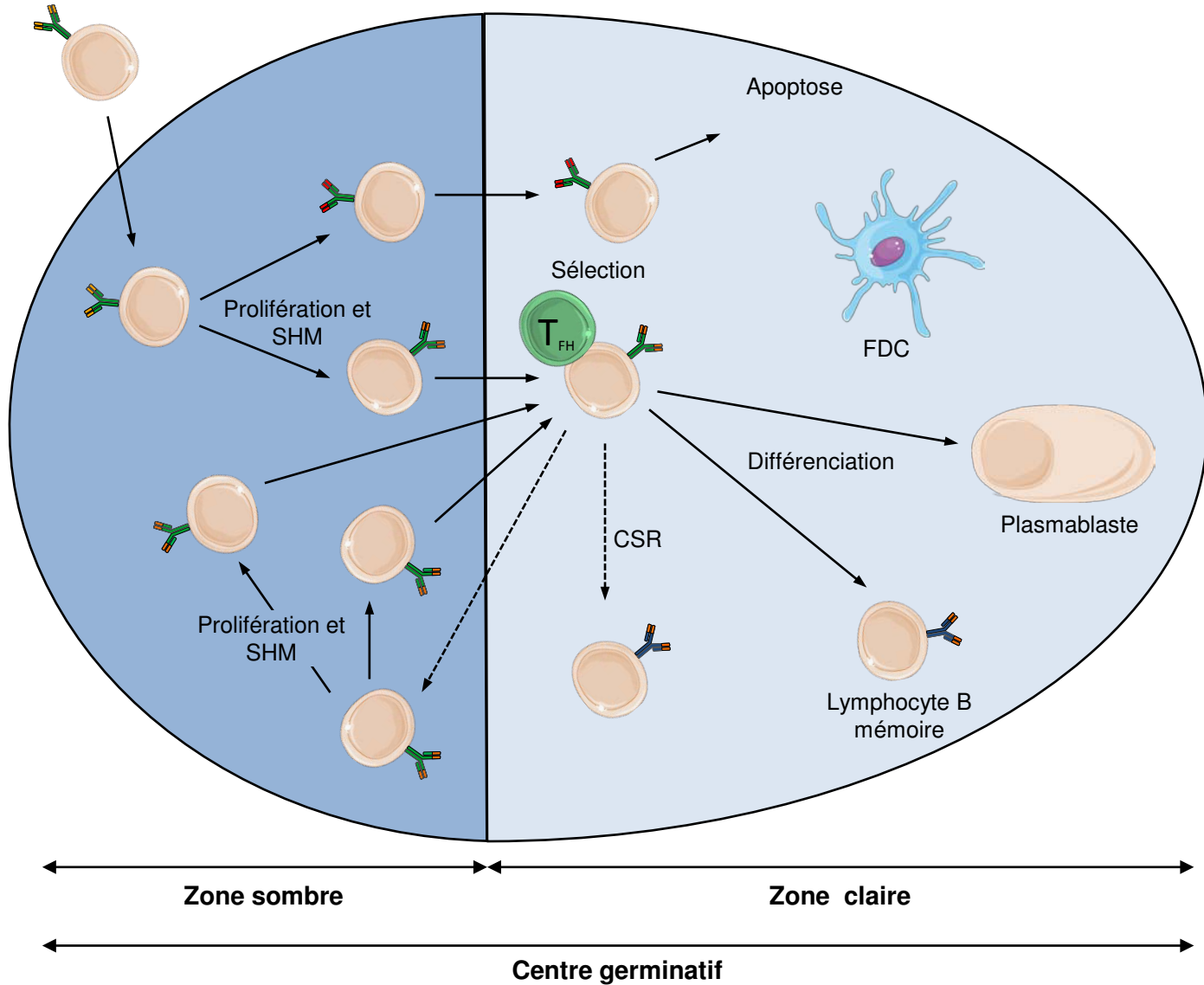


Figure 12 – Structure schématique d'un centre germinatif.

Après la rencontre avec l'antigène, les cellules B sont localisées dans la zone sombre (bleue foncée sur la figure) où elles subissent la SHM. Elles migrent ensuite dans la zone claire (bleue claire) où leur affinité pour l'antigène sera testée avec l'aide des TFH (T folliculaire Helper) et des FDC (Follicular Dendritic Cells). Elles pourront ensuite se différencier en B mémoires ou en plasmablastes. Adapté d'après De Silva et Klein, 2015

L'activation simultanée du BCR et des TLRs va induire une différenciation rapide en plasmablastes sécréteurs d'anticorps à courte durée de vie, majoritairement de façon T indépendante (Martin et al., 2001; Balázs et al., 2002). La majorité des Ig sécrétées seront d'isotype IgM, mais une partie des B MZ peut sécréter des IgG ou des IgA après avoir subi une CSR (MacLennan et al., 2003). La sécrétion en grande quantité d'Ig de faible affinité constitue une réponse rapide T indépendante à la rencontre d'antigènes transportés par le sang, et représente le rôle principal des B MZ (Cerutti et al., 2013). Toutefois, ils sont également capables de répondre à une stimulation T dépendante et de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie, sécrétant des Ig de haute affinité (Song and Cerny, 2003).

2.c Lymphocytes B Folliculaires et formation du centre germinatif

Les lymphocytes B FO représentent la majorité des B de la rate et sont, comme leur nom l'indique, localisés dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires (Allman and Pillai, 2008). Le centre de ces follicules est occupé par un réseau de cellules dendritiques folliculaires (FDC, pour Follicular Dendritic Cell), et ils sont entourés par des zones riches en lymphocytes T (nommées « zones T »). L'activation des cellules B par un antigène va entraîner leur migration dans la zone interfolliculaire, où ils vont interagir avec les lymphocytes T, ce qui va entraîner la formation d'un centre germinatif (GC, pour germinal center) (Okada and Cyster, 2006; Qi et al., 2008; Batista and Harwood, 2009).

Au sein de ce GC, les lymphocytes B vont proliférer très rapidement, et subir les réarrangements secondaires (SHM et CSR, qui seront détaillés dans le chapitre suivant), couplés à une sélection permettant de favoriser le développement des cellules exprimant les Ig de plus haute affinité pour l'antigène. La prolifération et la sélection des clones sont séparées physiquement : la prolifération a lieu dans la « zone sombre » du GC, tandis que la sélection a lieu dans la « zone claire », en présence de lymphocytes T et de FDC (**Fig. 12**). Les lymphocytes B vont effectuer des cycles d'aller-retour entre les deux zones afin de sélectionner les clones les plus affins pour l'antigène. Ainsi, les lymphocytes B sortent de la zone sombre après une phase de prolifération et vont entrer en compétition dans la zone claire pour interagir avec les LT CD4⁺ (LT_{FH}, pour Lymphocytes T Follicular Helper) et les FDC (MacLennan, 1994; Victora and Nussenzweig, 2012). Ces cellules fourniront les signaux nécessaires à la survie et à la prolifération aux cellules possédant une forte affinité pour

l'antigène présenté. Inversement, les cellules ayant un BCR de faible affinité ou auto-réactif entreront en apoptose. Les cellules ainsi sélectionnées retournent ensuite dans la zone sombre, où elles vont reprendre leur prolifération et subir à nouveau la SHM pour augmenter encore leur affinité. Les réactions au sein du GC vont ainsi permettre de favoriser la prolifération des LB possédant les récepteurs les plus affins pour l'antigène, avant leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps ou en B mémoire, grâce à plusieurs cycles de prolifération/sélection (Pour revue : De Silva and Klein, 2015).

3 Différenciation finale : sécrétion d'anticorps et mémoire immunitaire

A l'issu de leur différenciation, les lymphocytes B auront deux grands rôles : d'une part la sécrétion d'anticorps pour lutter contre les pathogènes, et d'autre part la mise en place d'une mémoire immunitaire, qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec le même antigène.

La sécrétion d'anticorps est assurée par des plasmocytes. On distingue les plasmocytes à courte durée de vie, majoritairement issus de B MZ ou de B1 après une activation T indépendante, exprimant principalement des IgM, et les plasmocytes à longue durée de vie, principalement issus de B FO, exprimant des Ig d'autres isotypes après une activation T dépendante. Les plasmocytes à courte durée de vie sont peu ou pas hypermutés et possèdent une affinité limitée pour l'antigène. Ils sont actifs lors des étapes précoces de la réaction immunitaire. Inversement, les plasmocytes à longue durée de vie sont issus de cellules ayant subi la réaction du centre germinatif et expriment des anticorps de forte affinité pour l'antigène (Pour revue : Nutt et al., 2015).

La mémoire lymphocytaire B est divisée en deux : on distingue la mémoire humorale constitutive et la mémoire humorale réactive. La mémoire constitutive correspond aux plasmocytes à longue durée de vie, qui sont principalement localisés dans la moelle osseuse, et seront mobilisés en premier lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène. La mémoire réactive est constituée de lymphocytes B à longue durée de vie, capable de rejoindre les centres germinatifs formés lors d'une rencontre avec un antigène et d'optimiser à nouveau l'affinité de leur récepteur. Cette mémoire, qui constitue la base de la vaccination, permet à

l'organisme de réagir de façon beaucoup plus rapide et efficace face à un pathogène rencontré une deuxième fois (Pour revue : Kurosaki et al., 2015).

4 Les B régulateurs

Au delà de leur rôle de sécréteurs d'Ig, les lymphocytes B jouent également un rôle de modulateur de la réponse immunitaire. Cette fonction de régulateurs négatifs a longtemps été sous estimée, les lymphocytes B étant généralement considérés comme des activateurs de part leurs capacités à produire des anticorps et activer les lymphocytes T en leur présentant les antigènes.

Il existe différentes populations de B régulateurs, qui peuvent être issus de lymphocytes B à différents stades de maturation (de T2 à plasmablastes). Leur mécanisme d'action principal est la sécrétion d'IL-10, une cytokine immunosuppressive. Ils peuvent également agir en sécrétant de l'IL-35 ou du TGF- β , ou encore en interagissant directement avec les lymphocytes T CD4⁺ via des protéines membranaires pour limiter leur prolifération ou induire leur apoptose (Pour revue : Mauri and Menon, 2015; Ray et al., 2015; Rincón-Arévalo et al., 2015).

Différentes études ont démontré l'importance des lymphocytes B régulateurs. Ainsi, un défaut dans ces sous populations est très fréquemment associé à des pathologies inflammatoires ou auto-immunes. Inversement, ils sont également impliqués dans l'atténuation de la réaction immunitaire anti-tumorale (Pour revue : Miyagaki et al., 2015; Zhang et al., 2015).

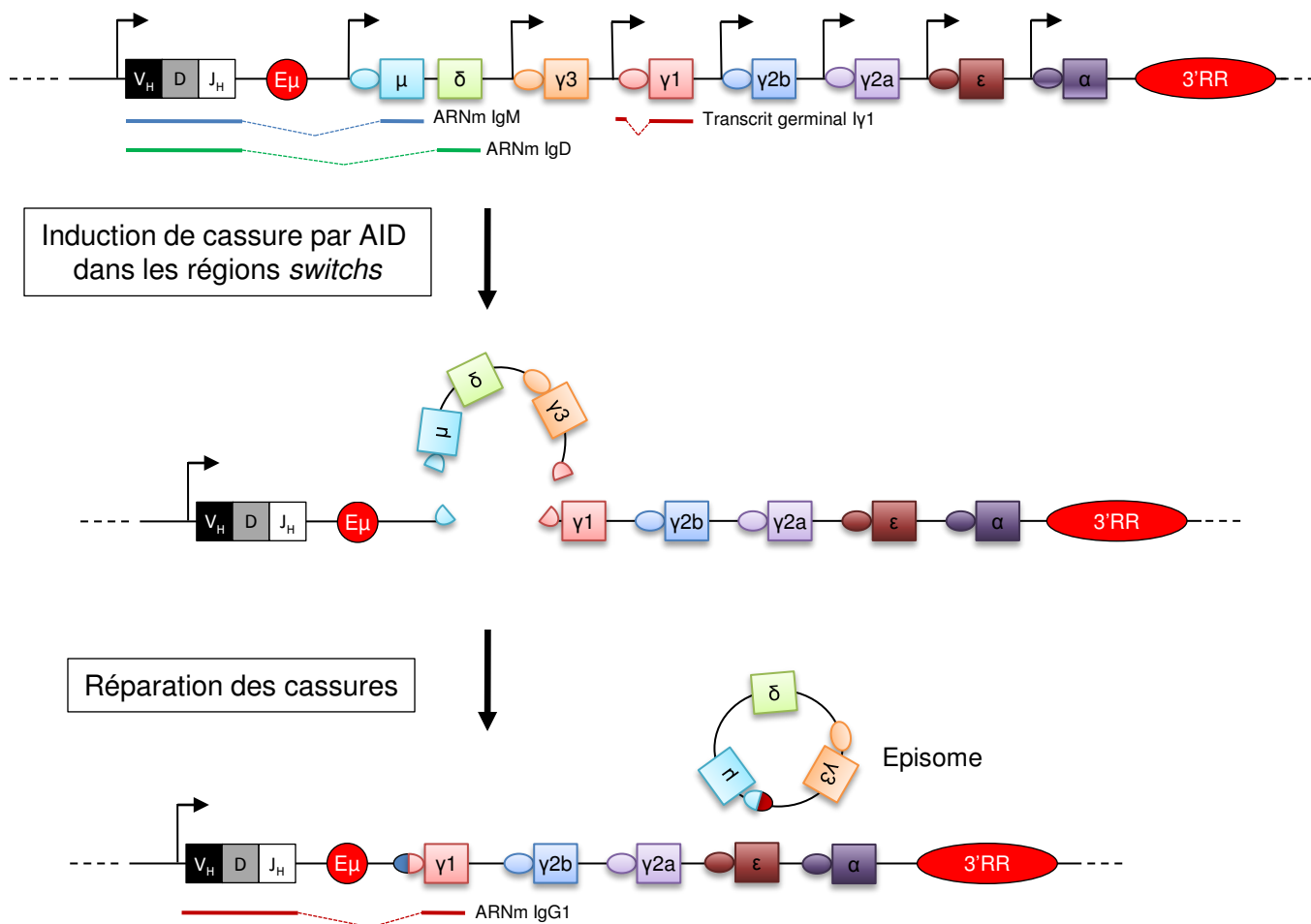


Figure 13 – Représentation schématique du mécanisme de CSR.

Les rectangles représentent les gènes codant les parties variables et constantes, les ovales les régions *switchs* qui leur sont associées, et les cercles rouges les *enhancer* du locus. L'enzyme AID induit une cassure dans la région *switch* donneuse (S_μ) et acceptrice (ici, S_{γ1}). Les deux régions *switchs* sont rapprochées puis ligaturées, tandis que la séquence entre les deux est circularisée sous forme d'épisome puis éliminée.

Chapitre 2: Recombinaisons secondaires : hypermutation somatique et commutation isotypique

Lors de leur maturation au sein des GC, les lymphocytes B matures activés par la rencontre avec l'antigène vont subir les mécanismes de recombinaisons secondaires : l'hypermutation somatique (SHM) et la commutation isotypique (CSR ou « switch »). La SHM correspond à l'induction de mutations dans la séquence codant les régions variables des chaînes lourdes et légères d'Ig, permettant d'augmenter l'affinité pour l'antigène. La CSR est une recombinaison permettant de changer l'isotype de l'Ig exprimée, en remplaçant le gène C μ par un gène localisé en aval codant un autre isotype, sans modifier la région variable. Bien que ces deux mécanismes soient différents, leur première étape implique la même enzyme : AID (Activation Induced cytidine Deaminase) (**Fig. 13**).

I) AID, enzyme clé des réarrangements secondaires

1 Structure et fonction de l'enzyme

L'enzyme AID et son rôle dans la CSR et la SHM ont été découverts en 1999 par l'équipe d'Honjo (Muramatsu et al., 1999). Elle fait partie de la famille protéique APOBEC (Apolipoprotein B RNA-Editing catalytic Component), qui est un sous groupe d'une superfamille de désaminases Zinc-dépendantes (Conticello et al., 2007). L'apparition des protéines AID/APOBEC au cours de l'évolution a eu lieu simultanément à l'apparition de l'immunité adaptative, chez les premiers vertébrés (Conticello, 2008) (**Fig. 14A**). Les plus anciens homologues d'AID ont été identifiés chez les poissons cartilagineux et chez les agnathes (poissons sans mâchoires, tels que les lamproies). Leur découverte chez les agnathes est particulièrement remarquable puisque l'immunité de ces vertébrés ne repose pas sur des Ig, mais sur des récepteurs variables nommés VLR (Conticello et al., 2005; Rogozin et al., 2007).

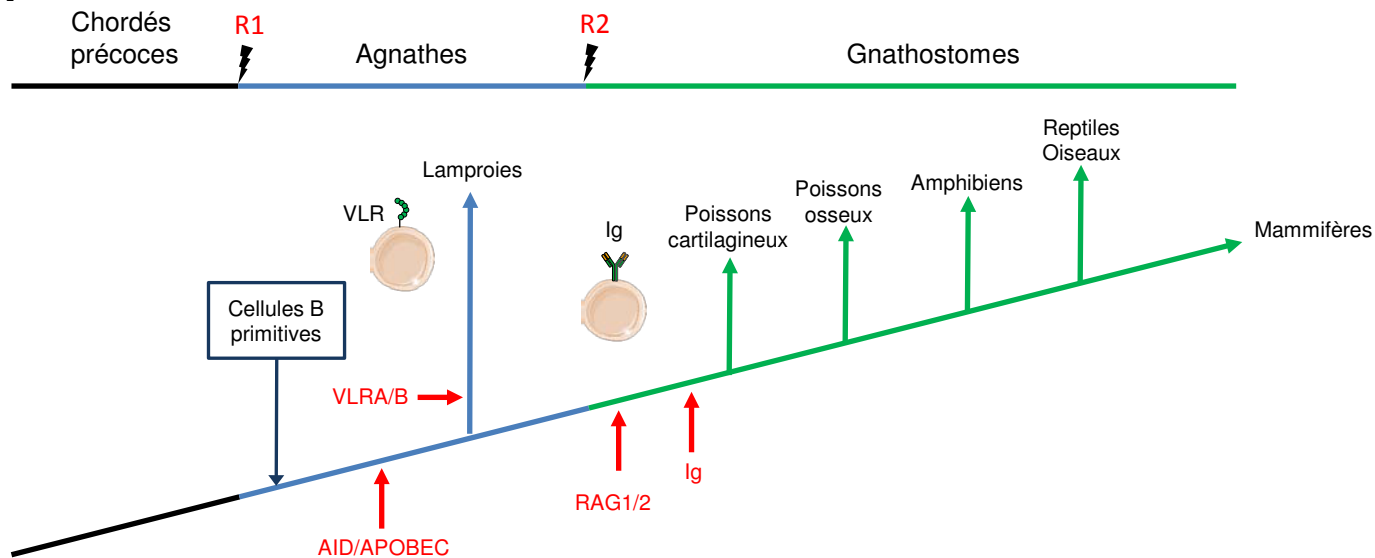
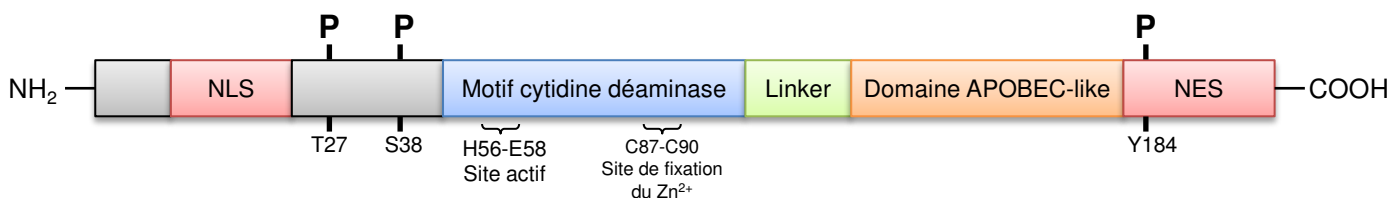
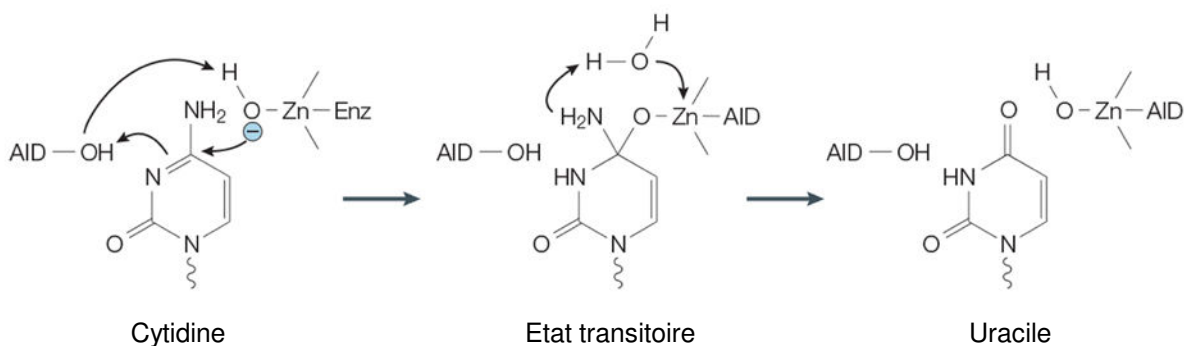
A**B****C**

Figure 14 – Evolution, structure et activité de l'enzyme AID.

(A) L'enzyme AID est apparue chez les agnathes et les poissons cartilagineux, simultanément à l'immunité acquise. (B) Elle contient des signaux d'export et de localisation nucléaire, un domaine APOBEC-like et un motif cytidine déaminase. (C) Elle catalyse la déamination d'une cytidine en coordonnant l'attaque nucléophile du groupement amine par un ion Zn²⁺. Adapté d'après Hirano et al., 2011 ; Peled et al., 2008 ; Chaudhuri et Alt., 2004.

AID est une petite protéine (198 acides aminés, 26kDa), codée par le gène *Aicda*. Sa structure primaire est simple, et similaire à celle des protéines APOBECs, notamment APOBEC-1 (**Fig. 14B**). De l'extrémité N-ter à l'extrémité C-ter, on distingue dans l'ordre un signal de localisation nucléaire, le domaine catalytique, une courte séquence « linker », un domaine APOBEC-like, et un signal d'export nucléaire. Le domaine catalytique s'étend des résidus 56 à 94 : le groupement carboxyle du résidu Glu58 catalyse la réaction de désamination, tandis que les résidus His56, Cys87 et Cys90 forment le site de fixation de l'ion Zn^{2+} nécessaire à la réaction. Le domaine APOBEC-like permet la fixation à l'ADN et assure la spécificité de l'enzyme (Ta et al., 2003; Zan and Casali, 2013). Les domaines C-ter et N-Ter possèdent des rôles différents : des mutations dans la région N-ter conduisent à une disparition de la CSR et de la SHM, tandis qu'une mutation dans le domaine C-ter ne perturbera que la CSR (Shinkura et al., 2004).

Par homologie avec les protéines APOBECs, il a d'abord été suggéré qu'AID agisse en désaminant l'ARN : c'est le modèle d'édition de l'ARN. Ce modèle propose qu'AID agisse en modifiant au moins deux ARNs. Le premier serait un miRNA, permettant de réprimer la synthèse de la topoisomérase 1 (Top1), ce qui aboutirait à l'accumulation de structure non-B de l'ADN facilitant l'apparition de cassures. L'édition d'un deuxième ARN permettrait d'amplifier le nombre de cassures dans ces structures non-B (Honjo et al., 2014). Cependant, des études ont montré que la diminution de l'expression de Top1 est insuffisante pour induire la CSR ou la SHM, que le KO d'AID dans des modèles murins ne modifie pas la synthèse de Top1, et enfin qu'AID ne peut pas utiliser l'ARN comme substrat *in vitro* (Bransteitter et al., 2003; Kobayashi et al., 2009; Maul et al., 2015).

Un autre modèle a été proposé pour expliquer l'induction de DSB et est aujourd'hui largement admis : celui de la désamination de l'ADN. Différentes études *in vitro*, confirmées plus tard par l'analyse de modèles murins, ont montré qu'AID agit sur l'ADN simple brin en désaminant une cytosine, créant ainsi un mésappariement U:G (**Fig. 14C**) (Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003; Pour revue : Chaudhuri and Alt, 2004). Plus précisément, AID désamine préférentiellement des cytosines dans des motifs WRC (où W=A/T et R=A/G), situées au sein de « bulles » d'ADN simple brin de 5 nucléotides de longueur, et au moins séparées par une base de la jonction ADN simple brin/ADN double brin (Pham et al., 2003; Larijani and Martin, 2007). Une étude biochimique a démontré que la présence du groupement hydroxyle en position 2' sur le sucre du desoxy-ribonucléotide est

nécessaire à la désamination, expliquant la préférence d'AID pour l'ADN plutôt que l'ARN (Nabel et al., 2013).

La désamination d'une cytosine par AID créant un mésappariement U:G constitue la première étape commune à la CSR et à la SHM. Les différences entre ces deux mécanismes sont principalement dues aux régions ciblées par AID et la façon dont seront traités les mésappariements. Les spécificités de chacun de ces phénomènes seront détaillées au cours de ce chapitre.

2 Régulation d'AID

L'action mutagène d'AID nécessite une régulation particulièrement stricte de son activité, qui doit être limitée aux loci d'Ig, dans des cellules B activées.

2.a Régulation transcriptionnelle

Cette régulation a tout d'abord lieu au niveau transcriptionnel. AID est exprimée dans les lymphocytes B du GC et dans les régions extrafolliculaires des organes lymphoïdes secondaires, là où la SHM et la CSR ont lieu (Muto et al., 2000; Cattoretti et al., 2006). Son expression est virtuellement nulle dans les B matures, mais est détectable à faible niveau aux stades pré et pro-B. Cette expression est beaucoup plus faible que dans les B du GC, mais semble suffisante pour induire un faible taux de SHM et de CSR (Mao et al., 2004; Han et al., 2007; Ueda et al., 2007). L'importance de cette expression lors des stades précoces n'est pas connue, mais des rôles ont été suggérés dans la diversification antigène-indépendante des Ig ou dans la tolérance immunitaire (Kuraoka et al., 2011; Meyers et al., 2011).

L'expression d'AID sera induite dans les B du GC lors de leur activation. Cependant, la fixation d'un antigène sur le BCR n'est pas suffisante pour cette activation, d'autres signaux sont nécessaires. Le BCR va agir en synergie avec les signaux transmis notamment par les récepteurs CD40, les TLR ainsi que BAFF-R et TACI. La signalisation via ces différents récepteurs va activer la voie NF- κ B, qui régule l'expression d'*Aicda* (He et al., 2010; Bombardieri et al., 2011; Pone et al., 2012). Les cytokines jouent également un rôle

important. Ainsi l'IL4 va induire une CSR vers IgG1 et IgE, tandis que le TGF- β va induire un switch vers IgA (Heldin et al., 1997; Dedeoglu et al., 2004).

L'expression d'*Aicda* est également régulée par des modifications épigénétiques : au stade mature, son promoteur est hyperméthylé, tandis que l'activation du lymphocyte B entraîne sa déméthylation et son enrichissement en variants d'histones associés à la transcription (H3K9ac/K14ac et H3K4me3). Inversement, après le déroulement de la SHM et de la CSR, le promoteur sera de nouveau hyperméthylé, ce qui réprimera l'expression prolongée d'*Aicda* (Crouch et al., 2007; Fujimura et al., 2008; Li et al., 2013a). La synergie entre ces différents mécanismes de régulation va permettre d'instaurer un équilibre entre l'activation et la répression du promoteur d'*Aicda*, grâce à la fixation de facteurs de transcription sur quatre éléments *cis*-régulateurs répartis de part et d'autre du gène, ainsi que dans ses régions introniques (Nagaoka et al., 2010).

2.b Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle

L'expression d'AID est également contrôlée au niveau post-transcriptionnel par des miRNA qui vont se fixer sur des sites de la région 3'UTR de l'ARNm d'AID. On trouve notamment miR-155, miR-181b, miR-361 et miR-93. Parmi ces miRNA, miR-155 est le plus étudié, et semble le plus important, puisqu'il joue d'une part un rôle de régulateur négatif d'AID, et d'autre part un rôle dans la différenciation et l'homéostasie lymphocytaire B (Teng et al., 2008; Bouamar et al., 2015; Pour revue : Lindsay, 2008). Enfin, la protéine AID est dégradée très rapidement par le protéasome, afin de limiter son activité à la durée nécessaire au déroulement de la CSR et de la SHM (Aoufouchi et al., 2008).

De manière surprenante, AID est préférentiellement localisée dans le cytoplasme, et doit être importée dans le noyau pour réaliser son activité catalytique (Rada et al., 2002a; Ito et al., 2004). Il a été démontré que l'import de l'enzyme vers le noyau ou son export vers le cytoplasme sont des mécanismes actifs, dépendants des séquences signales situées aux extrémités N-ter et C-ter de la protéine (Kudo et al., 1998; Pour revue : Patenaude and Di Noia, 2010). D'autre part, AID contient quatre sites de phosphorylation : T27, S38, T140 et Y184. Les résidus T27 et S38 sont phosphorylés par la protéine PKA et leurs mutations entraînent un défaut de SHM et de CSR, tandis que le résidu T140 est phosphorylé par la PKC et que sa mutation perturbe plus particulièrement la SHM. Au contraire des trois premiers

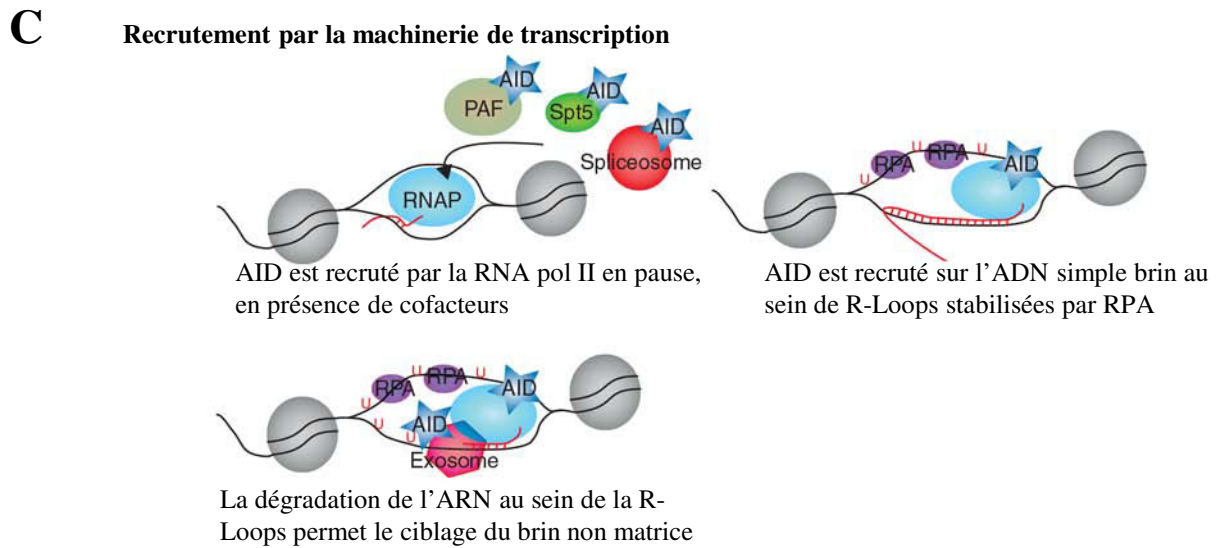
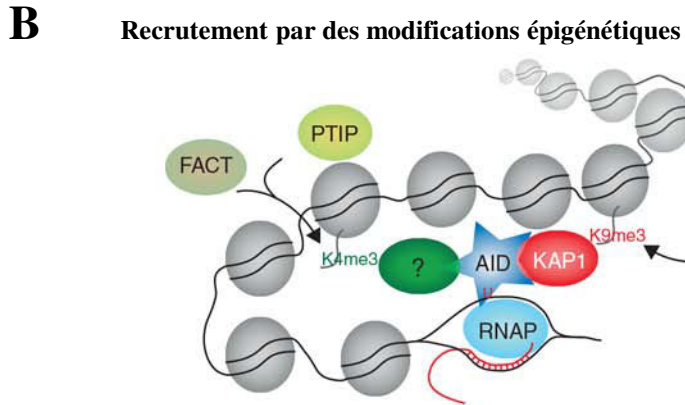
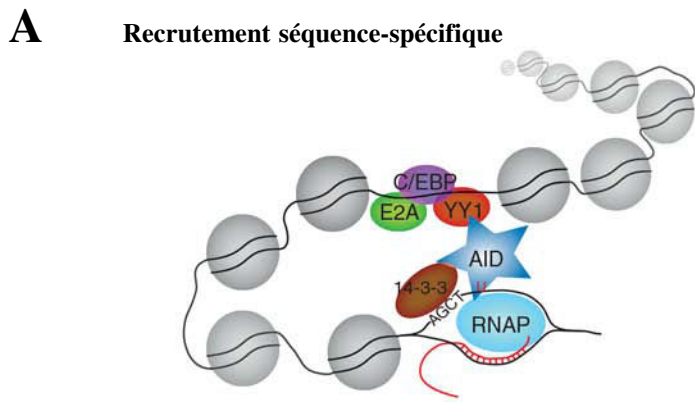


Figure 15 – Mécanisme de recrutement d'AID aux loci d'Ig

Représentation des trois mécanismes principaux de recrutement d'AID : (A) par des facteurs dépendants de la séquence, (B) par des modifications épigénétiques et (C) par la machinerie de transcription.

Les cercles gris représentent les octamères d'histones. Le trait rouge représente le brin d'ARN néo synthétisé. D'après Fear, 2013

sites, la phosphorylation sur le résidu Y184 ne semble pas jouer de rôle dans le fonctionnement d'AID (Basu et al., 2005; Pasqualucci et al., 2006; Basu et al., 2009). Enfin, une étude récente suggère que la structure tridimensionnelle d'AID limite son rendement, afin de réduire la fréquence des mutations induites lors de la stimulation (King et al., 2015).

L'ensemble de ces mécanismes de régulation permet de restreindre au maximum l'activité d'AID, et ainsi de limiter le risque d'accumulation de mutations potentiellement oncogéniques.

3 Recrutement d'AID aux loci d'Ig

L'activité mutagénique d'AID implique un ciblage précis sur les loci d'Ig, qui est permis d'une part par les caractéristiques des séquences cibles, et d'autre part par l'association d'AID avec d'autres protéines. On distingue trois grands mécanismes intervenant dans le ciblage : 1- les éléments séquences spécifiques, tels que les sites de fixation de facteurs de transcription, ou encore certains motifs d'ADN qui permettent le recrutement de protéines qui contribueront au ciblage d'AID ; 2- des modifications d'histones ; et enfin 3- la machinerie de biosynthèse de l'ARN, incluant la transcription, l'épissage et la dégradation (**Fig. 15**) (Fear, 2013).

3.a Recrutement séquence-spécifique

Les cibles d'AID, que ce soit pour la SHM ou la CSR, possèdent des séquences particulières. Pour la SHM, la séquence des régions variables est fortement enrichie en motifs WRC (W=A ou T ; R=G ou A) connus pour être des « hotspots » de mutations et pour faciliter la fixation d'AID (Pham et al., 2003; Kohli et al., 2010). Des études ont montré que les séquences mutées par AID sont enrichies en site de fixation de facteurs de transcription tels que E2A, YY1 ou C/EBP (Liu et al., 2008; Duke et al., 2013). En particulier, les motifs E-box (site de liaison à E2A) sont suffisants pour induire la SHM dans des gènes transcrits dans des lignées cellulaires transgéniques (Michael et al., 2003; Tanaka et al., 2010). Toutefois, la signification de cet enrichissement à proximité des gènes hypermutés est encore mal comprise, notamment suite à certaines études n'ayant pas montré d'enrichissement

similaire lors d'analyses des sites de cassures d'ADN ou de fixation directe d'AID (Staszewski et al., 2011a; Yamane et al., 2011).

En ce qui concerne la CSR, l'action d'AID doit être ciblée sur les régions dites « *switchs* » qui précèdent les gènes constants codant les différents isotypes d'Ig, à l'exception d'IgD. Les cassures doivent être induites à la fois dans la région dite donneuse, qui est toujours S μ , et dans une région acceptrice en aval, avant réparation de la cassure (Xu et al., 2012b). Ces séquences *switchs* sont enrichies en motifs AGCT, reconnus par les protéines adaptatrices 14-3-3 qui contribuent au recrutement d'AID (Zarrin et al., 2004; Xu et al., 2010). De manière similaire à ce qui a été observé pour les sites de fixation de facteurs de transcription, ces motifs AGCT sont fréquents à proximité de gènes mutés par AID, mais pas dans les séquences liées à AID identifiées par ChIP-seq (Staszewski et al., 2011b; Yamane et al., 2011; Fear, 2013). L'importance de la séquence nucléotidique des régions *switchs* a été confirmée par une étude montrant que la région S γ 1 subit la SHM même lorsqu'elle est insérée par *knock-in* dans un locus ne faisant pas partie des cibles légitimes d'AID (Chen et al., 2012).

3.b Recrutement par des marques épigénétiques

Les modifications d'histones sont fréquemment utilisées par les cellules pour cibler l'action de protéines sur leur chromatine (Gardner et al., 2011). Dans le cas de la SHM, les modifications H3K9ac/K14ac, H4K8ac et H3K4me3, associées à un état décondensé de la chromatine, sont enrichies dans les régions V(D)J. Ces modifications ne sont pas suffisantes pour cibler l'action d'AID, puisqu'elles ne sont pas spécifiques des régions hypermutées, mais sont nécessaires au déroulement optimal de la SHM. En effet, la diminution de ces marques, en utilisant des inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC) ou des modèles murins provoque une diminution de la fréquence de mutation (Woo et al., 2003; Odegard et al., 2005; Kitao et al., 2008; Begum et al., 2012). De même, l'hypométhylation de l'ADN semble jouer un rôle, puisque dans des cellules B portant deux allèles Igk réarrangés identiques, seul l'allèle hypométhylé est muté, malgré un niveau de transcription identique (Fraenkel et al., 2007).

De façon similaire, de nombreuses modifications d'histones ont été montrées comme étant associées à la CSR. On retrouve notamment les marques d'activation H2BK5ac,

H3K9ac/K14ac, H3K27ac, H4K8ac, H3K4me3 et H3K36me3 (Wang et al., 2009; Li et al., 2013a). Comme pour la SHM, ces modifications sont nécessaires pour le recrutement d'AID, mais on ignore comment AID peut interagir avec ces histones modifiées. En parallèle, une étude a démontré que l'on détecte la marque H3K9me3 dans S μ , mais pas dans les régions acceptrices, et que cette marque peut recruter les protéines KAP1 et HP1 (KRAB Associated Protein 1 et Heterochromatin Protein 1), qui elles-mêmes peuvent stabiliser AID sur S μ (Jeevan-Raj et al., 2011). Plus récemment, la modification d'histone combinée H3K9acS10ph a été identifiée comme étant enrichie spécifiquement dans les régions *switchs* activées pour la CSR, et capable de recruter les protéines adaptatrices 14-3-3, qui à leurs tours peuvent recruter AID (Li et al., 2013b).

L'importance de ces modifications d'histones dans le recrutement d'AID a été confirmée par leur enrichissement dans les gènes ciblés de façon illégitime (mutation « off-target ») par AID (Wang et al., 2014a).

3.c Recrutement par la machinerie de biosynthèse de l'ARN

Le ciblage d'AID par la machinerie de biosynthèse de l'ARN (regroupant transcription, épissage et dégradation) est l'aspect le plus étudié. La relation entre la transcription et la SHM a été suggérée dès 1996, avant même la découverte d'AID (Peters and Storb, 1996; Fukita et al., 1998). De nombreuses études ont depuis permis de préciser les mécanismes impliqués.

La capacité des régions *switchs* à être utilisées comme cible pour la CSR dépend de leur transcription dite « germinale » qui est un pré-requis essentiel à la CSR. Les gènes codant les différents isotypes forment une unité transcriptionnelle indépendante, comprenant dans l'ordre : un promoteur et un exon « I » (pour Intervening), une région *switch* intronique, et les exons C_H. Les transcrits primaires générés sont épissés entre le site donneur de l'exon I et le site accepteur du premier exon constant (CH1), formant des transcrits germinaux de type I_x-C_x (Chaudhuri and Alt, 2004). L'exon I μ est transcrit de façon constitutive, tandis que les exons I_x (x correspondant aux autres isotypes) ne sont transcrits qu'en réponse à une stimulation adéquate (Li et al., 1994; Matthews et al., 2014a). Ainsi, des lipopolysaccharides bactériens (LPS) vont activer la transcription d'I γ 3 et I γ 2b, et donc la CSR vers IgG3 et IgG2b. Une combinaison de LPS et d'interleukine 4 (IL4) activera la transcription d'I γ 1 et de

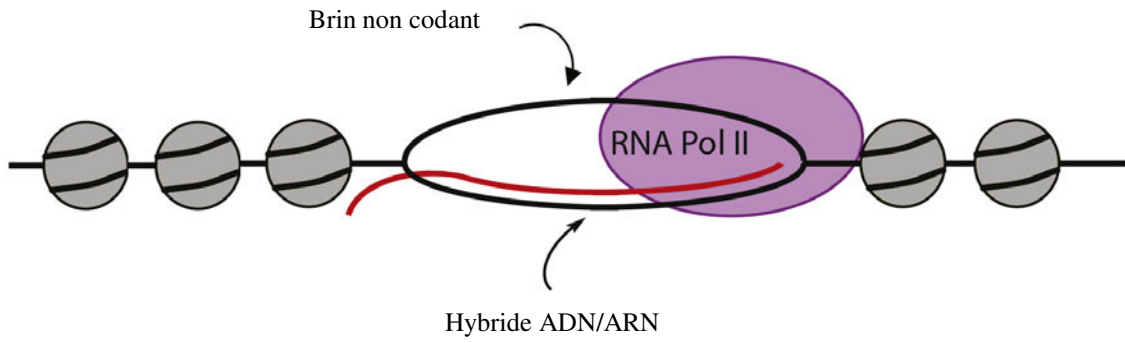


Figure 16 – Représentation schématique d'une R-Loop.

La RNA pol II est représentée en violet, les octamères d'histones en gris, et l'ARN néo transcrit en rouge. Adapté d'après Vertino et Wade, 2012

d'I ϵ et donc la CSR vers IgG1 et IgE. Les transcriptions d'I α et I γ 2a, et donc les CSR vers IgA et IgG2a seront activées par du LPS couplé au TGF- β (transforming growth factor β) ou à l'interféron γ (IFN- γ), respectivement (Stavnezer and Schrader, 2014; Vaidyanathan et al., 2014). Il est intéressant de noter que cette transcription germinale a lieu à la fois sur les deux allèles, productifs ou non, et qu'il est donc fréquent que les deux allèles recombinent vers le même isotype (Delpy et al., 2003).

La transcription des régions *switchs*, de par leur caractère répétitif et leur enrichissement en G sur le brin non matrice, va favoriser l'exposition d'ADN simple brin, cible d'AID, sous forme de R-Loops (**Fig. 16**). Ces R-Loops sont des structures particulières de l'ADN, formées lorsque l'ARNm néo-synthétisé s'hybride sur le brin matrice, laissant le brin codant exposé sous forme simple brin. Il est intéressant de noter que les R-loops ne sont pas spécifiques des régions *switchs* et des lymphocytes B. Ces structures ont été décrites pour la première fois en 1976 et découvertes *in vivo* en 1995 (Thomas et al., 1976; Drolet et al., 1995). Si leur effet délétère sur la stabilité génomique est connu depuis longtemps, ce n'est que récemment que plusieurs études ont montré qu'elles jouent un rôle de régulateurs de l'expression de certains gènes, en agissant sur la terminaison de la transcription, la méthylation des promoteurs, la présence de modifications d'histones répressives ou encore en favorisant le passage d'un gène à l'état hétérochromatinien (Ginno et al., 2012; Nakama et al., 2012; Sun et al., 2013; Skourti-Stathaki et al., 2014; Skourti-Stathaki and Proudfoot, 2014). On peut également noter que les R-Loops sont retrouvées dans des séquences enrichies en histones H3 phosphorylée sur la sérine 10 (H3S10ph), marque qui est associée à la CSR lorsqu'elle est couplée à l'acétylation d'H3K9 (H3K9acS10ph) (Castellano-Pozo et al., 2013).

Les R-Loops sont produites naturellement au cours de la transcription ou de la réplication. L'ADN simple brin ainsi exposé peut être une cause d'instabilité du génome en favorisant la désamination de cytosine en uracile (spontanée ou via l'action d'AID), en augmentant la sensibilité à des agents mutagènes, ou encore en perturbant la réplication. Pour limiter les effets délétères de ces structures, différents mécanismes permettent de limiter leur apparition et leur stabilité. On trouve d'une part des enzymes permettant de supprimer les R-Loops (RNase H, RNA/DNA Helicase, Topoisomérases...), ainsi que des protéines chargées de limiter leur apparition au cours de la transcription (Pour revue : Aguilera and García-Muse, 2012; Skourti-Stathaki and Proudfoot, 2014). Il est intéressant de noter qu'il existe également des protéines qui, à l'inverse, favorisent l'apparition de R-Loops. C'est par exemple le cas de

la protéine Rad51, connue pour son rôle dans la machinerie de recombinaison homologue, et capable de faciliter l'hybridation d'un ARN sur un brin d'ADN pouvant être différent de son site de synthèse (Wahba et al., 2013).

La présence de R-Loops au sein des loci d'Ig de mammifères dans des cellules B activées a été détectée pour la première fois en 2003 et a depuis été étudiée en détails, notamment par l'équipe de Lieber. Les R-loops y sont sensiblement différentes de celles retrouvées ailleurs dans le génome, de part leur grande taille (parfois supérieure à 1kb), leur stabilité et la fréquence à laquelle elles sont créées (Yu et al., 2003; Roy et al., 2008, 2010; Kao et al., 2013; Zhang et al., 2014a). Il a récemment été montré que l'efficacité d'une région *switch* à induire la CSR dépend directement de sa capacité à former des R-Loops, et donc que ces structures sont un élément clé de la régulation de la machinerie de la CSR (Zhang et al., 2014b). Notons que pour la SHM, l'ADN simple brin n'est pas exposé au sein de R-Loops, mais sous forme de « *patches* » courts, dépendants de la présence de complexes protéiques (Ronai et al., 2007).

Une fois les deux brins d'ADN dissociés, la protéine RPA (Replication Associated Protein A) va pouvoir se fixer sur l'ADN simple brin et stabiliser les structures formées (Chaudhuri et al., 2004). Si les interactions entre AID et RPA sont bien identifiées, le rôle exact joué par ce cofacteur est encore mal compris. Ainsi, on sait que la phosphorylation d'AID par PKA est nécessaire pour son interaction avec RPA, elle-même requise pour l'activité d'AID, mais aucun de ces deux cofacteurs n'est requis pour le recrutement d'AID sur l'ADN simple brin (Basu et al., 2005; Vuong et al., 2009; Maul and Gearhart, 2010). Une étude plus récente suggère que le recrutement d'AID précéderait celui de RPA, qui permettrait alors d'amplifier l'action d'AID sur l'ADN simple brin en le stabilisant (Yamane et al., 2011).

In vivo, AID cible à la fois le brin matrice et le brin non matrice (Xue et al., 2006). Or, seul le brin non matrice, enrichi en G, est capable de supporter l'apparition de R-Loops stables (Shinkura et al., 2003; Zhang et al., 2014a). Il a été suggéré que l'exposition d'ADN simple brin sur le brin matrice puisse être due à leur transcription en orientation antisens, détectée selon un profil similaire à celui de la transcription germinale sens (Perlot et al., 2008). Cependant, une étude a récemment démontré que seule la transcription sens est nécessaire à la CSR, tandis que le blocage de la transcription antisens ne l'affecte pas (Haddad et al., 2011). Plus récemment, une analyse biochimique a permis de démontrer que

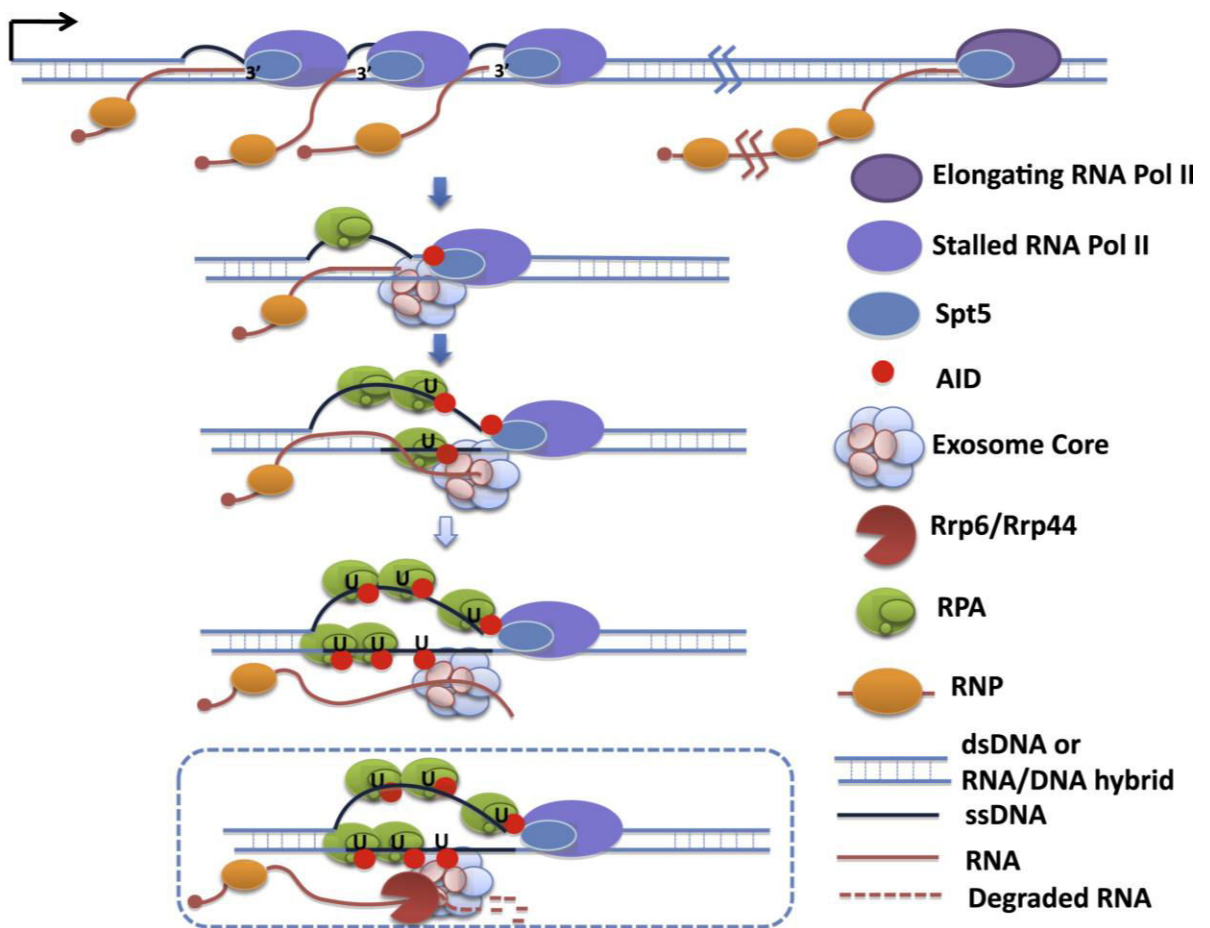


Figure 17 – Rôle du RNA exosome lors du ciblage du brin codant par AID.

La RNA pol II en pause, liée à son co-facteur Spt5, va recruter AID, qui à son tour va recruter le RNA exosome. Il n'est pas exclu que le RNA exosome puisse également être directement recruté par la RNA pol II en pause. L'exosome va ensuite dégrader le brin d'ARN néo transcrit et ainsi libérer le brin codant sous forme simple brin, permettant son ciblage par AID. D'après Basu et al., 2011

c'est le complexe du RNA exosome qui permet d'exposer le brin codant sous forme simple brin, en dégradant l'ARN au sein de l'hybride ARN/ADN (**Fig. 17**). Cependant, le RNA exosome ne peut se fixer à un brin d'ARN que si son extrémité 3' est libre, ce qui n'est pas le cas en cours de transcription. Les auteurs ont proposé que ce brin 3' soit exposé lorsque la RNA pol II fait « marche arrière » (backtracking), ce qui arrive fréquemment lorsqu'elle est en pause (Adelman et al., 2005; Basu et al., 2011). Une étude plus récente suggère que l'accumulation de RNA pol II en pause au sein des régions variables, couplée au recrutement de la protéine Spt5, favoriserait la terminaison prématurée de la transcription. Une fois la RNA pol II retirée, le RNA exosome pourrait accéder à l'ARN au sein du complexe ADN/ARN et le dégrader, exposant ainsi le brin codant à l'action d'AID (Wang et al., 2014b).

Outre la nécessité de la transcription pour permettre l'accessibilité d'AID aux séquences d'ADN, il a également été démontré une interaction directe entre la RNA polymérase II (RNA Pol II) et AID. La RNA pol II existe sous deux formes : phosphorylée sur la serine 5 (p-Ser5) lorsqu'elle est en pause au niveau du promoteur, avant le début de l'élongation ; et phosphorylée sur la serine 2 (p-Ser2) au cours de l'élongation (Chandra et al., 2015). Dans la majeure partie des cas, la transition de l'état p-Ser5 à p-Ser2 se fait lors de la lecture de la première centaine de paires de bases après le promoteur (Brookes et al., 2012; Kwak and Lis, 2013).

Cependant, au locus IgH, la RNA pol II sous forme p-Ser5 est retrouvée plusieurs centaines de paires de bases en aval du promoteur, que ce soit dans les régions *switchs* ou dans les régions variables (Wang et al., 2009; Maul et al., 2014). S'il est admis que les R-Loops au sein des régions *switchs* sont responsables de l'accumulation de RNA pol II, la raison du maintien de l'état « en pause » dans les régions variables reste encore à déterminer (Maul et al., 2014). Une première hypothèse suggère que la pause soit favorisée par des séquences en *cis*, localisées dans les introns J_H qui formeraient des structures secondaires au cours de la transcription (Wright et al., 2008). Le prolongement de la pause pourrait également être du à l'épissage co-transcriptionnel qui a lieu entre l'exon leader et les exons VDJ réarrangés. La machinerie transcriptionnelle serait ralentie par les différentes réactions d'épissage simultanées, et le ralentissement de la progression des bulles de transcription favoriserait l'accumulation de RNA pol II p-Ser5. Cette deuxième hypothèse est renforcée par le fait que les protéines CTNNBL1 et PTBP2, associées au spliceosome fixent la protéine

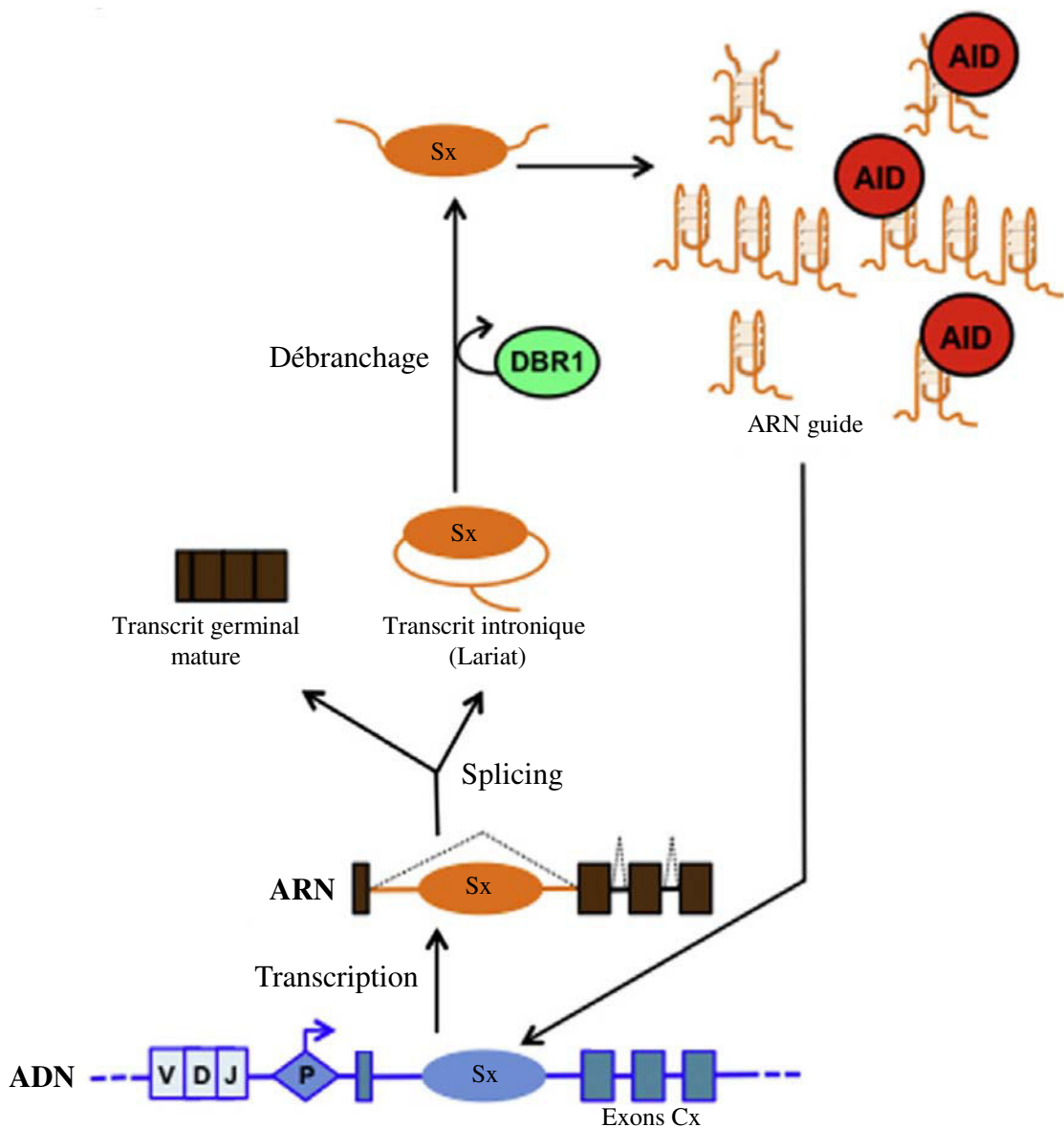


Figure 18 – Ciblage d'AID par des ARN non codants.

Les transcrits germinaux sont épissés, formant d'une part un transcrit germinale mature, et d'autre part un transcrit intronique qui sera linéarisé sous forme de « lasso », appelé structure de Lariat. Cette boucle sera ouverte (« débranchée ») par l'enzyme DBR1, formant des ARN « guides » qui permettront de cibler l'action d'AID sur les régions *switchs*. Adaptée d'après Zheng et al., 2015

AID (Conticello et al., 2008; Nowak et al., 2011). De plus, deux études ont montré qu'en absence d'épissage (dans des modèles murins de délétion des sites donneurs d'épissage) la CSR est inhibée, confirmant le rôle du spliceosome et/ou des transcrits épissés dans le recrutement d'AID (Lorenz et al., 1995; Hein et al., 1998).

Si le mécanisme exact par lequel le spliceosome favorise le recrutement d'AID n'est pas encore bien connu, un rôle a récemment été identifié pour les transcrits germinaux stériles. Les régions introniques épissées sont générées sous forme de lassos, dites structures de Lariat (**Fig. 18**). Cette forme circulaire va être linéarisée par l'enzyme DBR1 (debranching RNA lariats 1). L'ARN linéaire ainsi formé, riche en G, va former des quadruplexes de G qui lui permettront de se lier à l'enzyme AID et ainsi de servir de « guide » à l'enzyme pour la diriger vers les régions switchs (Zheng et al., 2015).

Toutes ces données montrent que l'activité d'AID est régulée par plusieurs facteurs pour limiter au maximum son action, l'objectif étant de limiter au maximum le risque de mutations « off target ». Cette régulation passe d'une part par une expression et une localisation étroitement contrôlée, et d'autre part par un ciblage très précis sur les loci d'Ig. La nécessité de plusieurs facteurs (séquences spécifiques, modifications épigénétiques, transcription, épissage, formation de R-Loops, recrutement de co-facteurs...) limite le risque de recrutement d'AID sur des cibles illégitimes (Chandra et al., 2015).

4 AID et déméthylation de l'ADN

L'hypothèse d'un rôle d'AID dans la déméthylation active de l'ADN a été émise en 2004 et a depuis fait l'objet de nombreuses publications, mais reste un sujet controversé (Morgan et al., 2004; Ramiro and Barreto, 2015). La désamination par AID d'une 5-méthylcytosine (5mC), plutôt qu'une cytosine, provoquerait l'apparition d'un mésappariement T:G (au lieu de U:G). Le T ainsi formé serait alors pris en charge par des glycosylases et la voie du BER, et remplacé par un C non méthylé. Cette hypothèse est particulièrement intéressante, car jusqu'à présent aucune 5mC-déméthylase spécifique n'a encore été identifiée chez les vertébrés (Bhutani et al., 2011; Franchini et al., 2012; Nabel et al., 2012a).

Différentes études *in vitro* ont prouvé la capacité d'AID à déaminer une 5mC, mais elles ont également montré que l'affinité d'AID pour ces 5mC est beaucoup plus faible que pour une cytosine non méthylée (10 à 22 fois plus faible selon les modèles utilisés) (Pham et al., 2003; Nabel et al., 2012b; Wijesinghe and Bhagwat, 2012; Abdouni et al., 2013). Cette différence d'affinité a même conduit certains auteurs à suggérer que la méthylation des cytosines représenterait en fait une protection contre l'action d'AID (Larijani et al., 2005).

Le rôle potentiel d'AID dans la déamination active de l'ADN a été étudié en détail au sein des cellules souches induites (iPSCs, pour induced Pluripotent Stem Cells), dans lesquelles la reprogrammation du génome est particulièrement importante. Une première étude a démontré que la transfection d'un vecteur permettant l'expression d'AID dans des fibroblastes permet d'obtenir 2 à 4 fois plus de clones d'iPSC, tandis que la diminution de l'expression d'AID par shRNA conduit à une baisse du nombre de clones (Bhutani et al., 2013). Inversement, une autre équipe utilisant pourtant un système similaire rapporte que les cellules AID^{-/-} répondent plus rapidement et plus efficacement à la reprogrammation, mais ont tendance à perdre leur pluripotence après 4 semaines (Kumar et al., 2013). En parallèle, deux autres équipes ont montré que la délétion ou la surexpression d'AID n'entraînait aucun effet sur la reprogrammation des iPSCs et le maintien de leur pluripotence (Habib et al., 2014; Shimamoto et al., 2014).

AID étant principalement exprimée dans les lymphocytes B activés, son rôle dans la déméthylation active au sein de ces cellules a été étudié. Une première analyse sur des cellules activées *ex vivo* n'a pas montré de différence dans les profils de méthylation entre des souris *Wt* et AID^{-/-} (Fritz et al., 2013). Cependant, une étude plus récente a montré qu'*in vivo*, les cellules B subissent au sein des GC des modifications de leur profil de méthylation, et que ces modifications n'ont plus lieu dans des souris AID^{-/-}. Les auteurs suggèrent que les différences obtenues entre les analyses *ex vivo* et *in vivo* montrent un lien entre la SHM et la déméthylation des 5mC, puisque la SHM est également fortement diminuée lors de stimulations *ex vivo* (Dominguez et al., 2015).

Le rôle d'AID dans la déméthylation active de l'ADN est donc encore controversé, malgré de nombreuses études (Pour revue détaillée : Ramiro and Barreto, 2015). L'hypothèse d'un rôle d'AID dans la déméthylation du génome lors de la reprogrammation génétique, notamment dans les cellules souches, semble désormais peu plausible, mais un rôle plus ciblé, notamment dans les cellules B activées du GC semble probable.

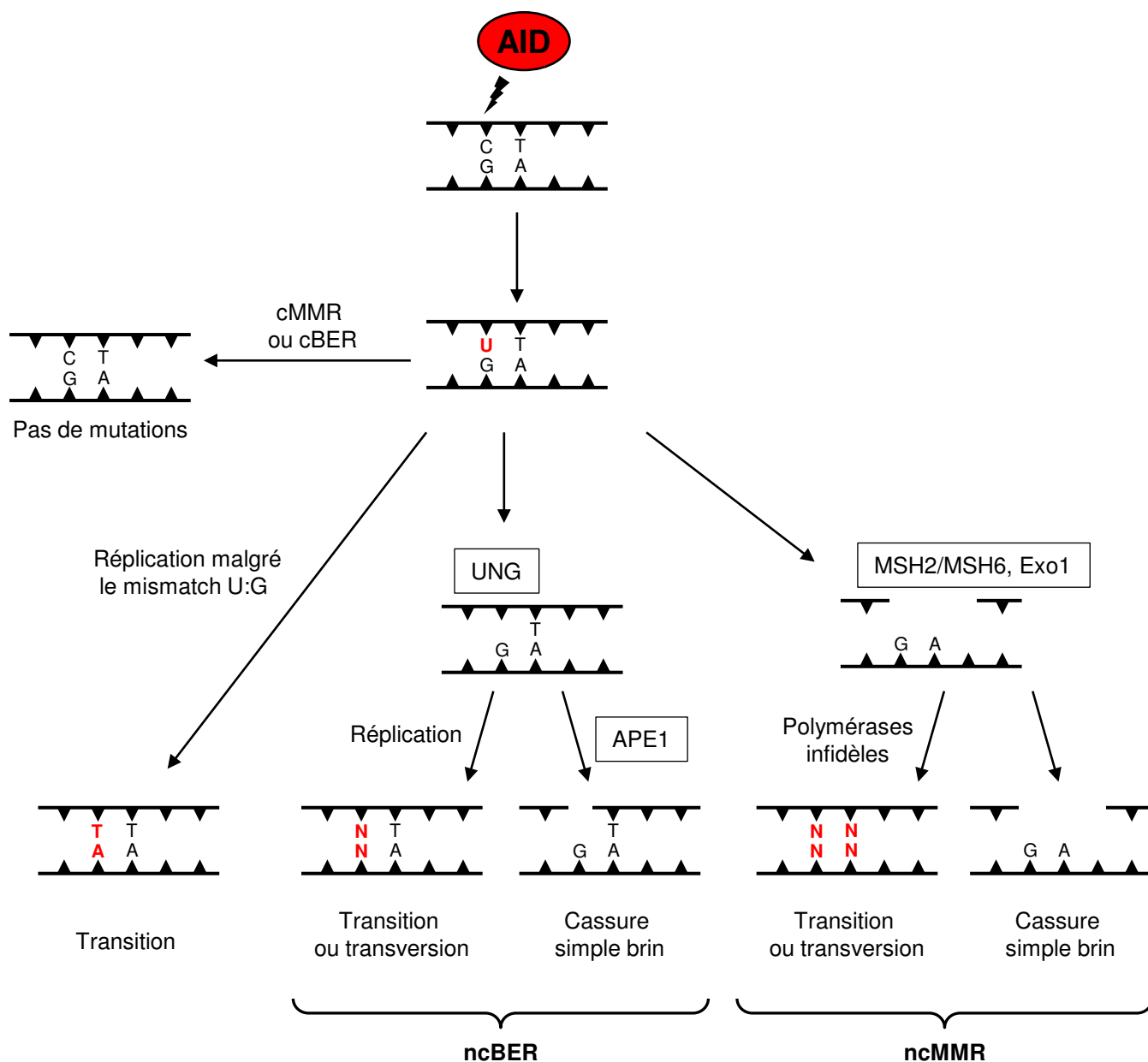


Figure 19 – Mécanisme d’induction de mutations après déamination par AID.

Le mésappariement créé par AID peut être pris en charge de plusieurs façons : il peut tout d’abord être réparé par les voies classiques de MMR ou BER, sans générer de mutations. L’ADN peut être répliqué sans tenir compte du mésappariement, provoquant une transition. L’uracile créé peut être retiré par UNG. Le site abasique généré sera soit répliqué, soit retiré par APE1, provoquant respectivement une mutation ou une cassure simple brin, cette dernière étant réparée par des polymérases infidèles. Enfin, le mésappariement peut être pris en charge par la voie du MMR, qui entrainera l’apparition de mutations ou de cassures simples brins. Adapté d’après Hwang et al., 2015

II) CSR ou SHM : Cassure double brin ou mutation ?

Bien que les mécanismes utilisés soit sensiblement différents, les premières étapes de la CSR et de la SHM aboutissent au même point : la déamination d'une cytosine et la création d'un mésappariement U:G, qui sera pris en charge par les voies du MMR et du BER. A partir de ce stade, les mécanismes mis en jeu vont différer, au moins partiellement, pour aboutir soit à l'apparition de mutations, soit à la recombinaison entre deux régions *switchs*.

1 Prise en charge des mésappariements lors de la SHM

Le mésappariement U:G créé suite à l'action d'AID peut être pris en charge par deux voies de réparation de l'ADN : la voie du BER (Base Excision Repair) et du MMR (MisMatch Repair). Ces voies ne sont pas spécifiques des lymphocytes B et réparent généralement l'ADN de façon très fidèle. Au contraire, lors de la SHM, les réparations doivent être infidèles afin de générer des mutations à une fréquence élevée (jusqu'à 10^{-3} mutations par paires de bases) et plus rarement des cassures doubles brins (Noia and Neuberger, 2007). On distingue donc les voies du BER et du MMR dites « conventionnelles » (cBER et cMMR), fidèles et nécessaires au maintien de l'intégrité du génome des voies « non conventionnelles » (ncBER et ncMMR), infidèles et requises pour la SHM (**Fig. 19**).

Il est intéressant de noter qu'une partie des mésappariements U:G peut être réparée par les voies conventionnelles et ainsi ne pas générer de mutations. Il est cependant difficile d'estimer la fréquence de ces réparations fidèles puisqu'elles ne laissent pas de marques détectables sur la séquence (Martin et al., 2015). L'ADN contenant le mésappariement peut également être simplement répliqué, la polymérase considérant le dU comme un dT, entraînant ainsi une transition dC/dT sur le brin désaminé, et donc dG/dA sur le brin complémentaire (Peled et al., 2008).

La voie du MMR intervient dans la réparation des insertions, délétions ou mésappariements qui apparaissent fréquemment lors de la réplication de l'ADN (**Fig. 20**) (Hsieh, 2012). Dans un premier temps, les mésappariements vont être détectés par un hétérodimère MSH2/MSH6, aussi appelé MutS α , qui recrutera l'hétérodimère adaptateur MLH1/PMS2 (MutL α) (Jiricny, 2006; Saribasak and Gearhart, 2012; Hwang et al., 2015). MutL α va permettre d'induire la résection du brin d'ADN encadrant le mismatch par l'exonucléase Exo1, sur une longueur allant d'une dizaine de base (« *short patch* MMR ») à

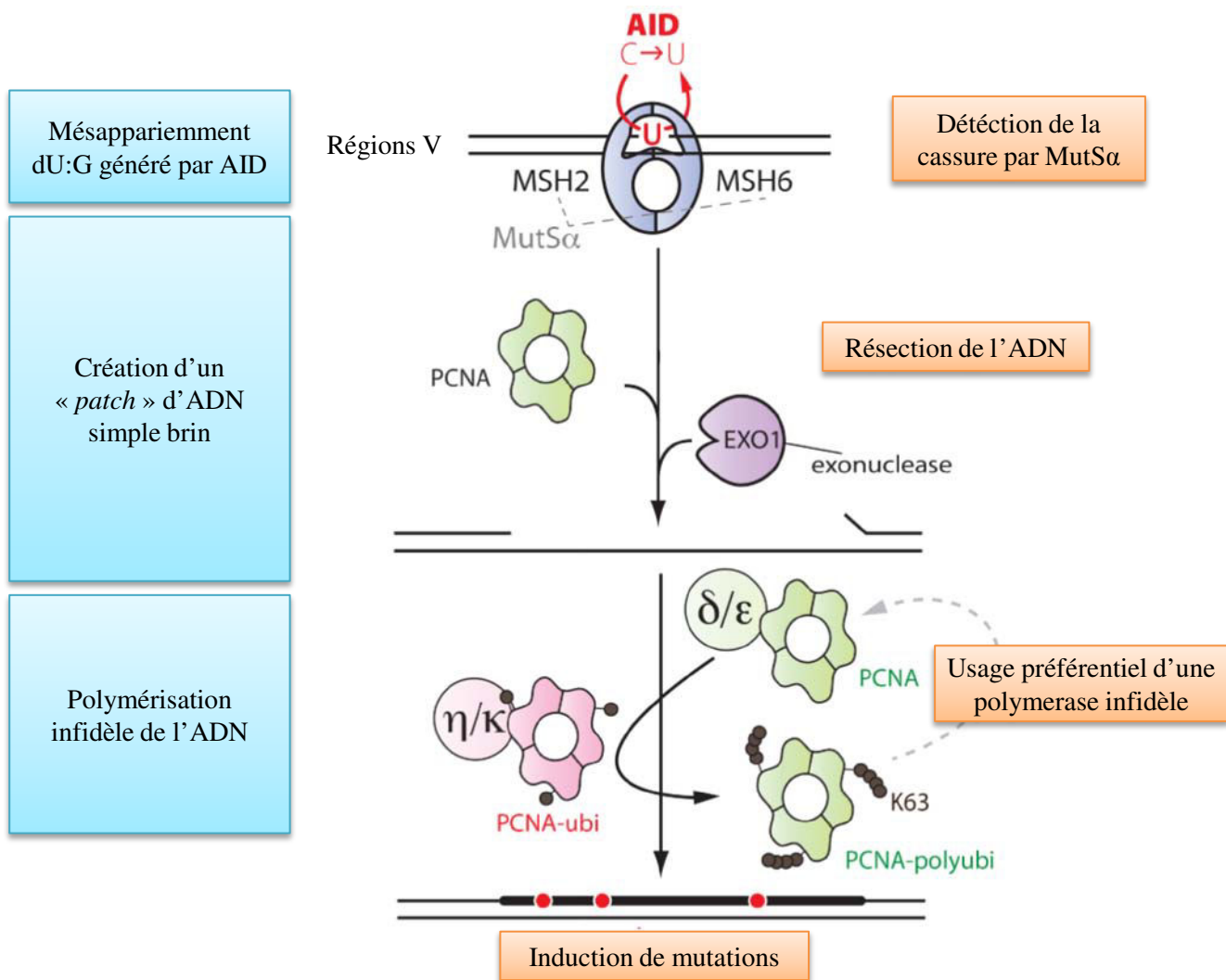


Figure 20 – Induction de mutations dans les gènes d'Ig par la voie du MMR.

La reconnaissance d'un mésappariement dU:G par MutSα va entraîner le recrutement de protéines dont PCNA et Exo1, qui permettra la résection du brin d'ADN. La forme poly-ubiquitinée de PCNA va favoriser le recrutement de polymérase infidèle qui vont resynthétiser le brin d'ADN en y insérant des mutations. Adapté d'après Chahwan et al., 2012

plusieurs kilobases (« *long patch* MMR ») (Iyer et al., 2006). C'est à cette étape que vont apparaître les différences entre la voie du cMMR et du ncMMR, lorsque MutL α va recruter la protéine PCNA : sous forme poly-ubiquitinée, cette dernière recrutera des polymérases fidèles, tandis que sous forme mono-ubiquitinée, elle recrutera les polymérases infidèles nécessaires à la SHM telles que pol η , qui assureront la synthèse du brin excisé par Exo1. Enfin, la ligase 1 assurera la ligature du brin néosynthétisé (Saribasak and Gearhart, 2012; Martin et al., 2015).

La voie du BER (Base Excision Repair) intervient principalement pour réparer les lésions de l'ADN dues à une oxydation, une alkylation, une excision de base ou dans le cas qui nous intéresse ici, une déamination (Robertson et al., 2009). Lors de la SHM, le dU créé par AID sera reconnu et excisé par la protéine UNG (Uracil DNA-Glycosylase), formant un site abasique. Ce dernier sera détecté par une endonucléase apurinique/ apyrimidique (APE1), qui clivera le squelette de l'ADN immédiatement en 5' du site abasique, générant ainsi une cassure simple brin (Masani et al., 2013). Cette cassure sera immédiatement prise en charge par des protéines recrutées par APE1, dont FEN1, PCNA, XRCC1 et la DNA ligase 1 ou 3. Bien que cela n'ait jamais été démontré, il est probable que comme dans le cas du MMR, PCNA soit responsable du recrutement de polymérases infidèles et donc du choix de la voie du ncBER plutôt que du cBER (Dianova et al., 2001; Martin et al., 2015).

La résolution de la cassure simple brin par la voie du BER peut se faire selon deux mécanismes : on distingue le « *short patch* » et le « *long patch* » BER (**Fig. 21**). Lors du short patch BER, une DNA lyase va exciser une base qui sera remplacée par la polymérase infidèle β ou λ et ligaturée par la DNA ligase 1 ou 3. Lors du *long patch* BER, les DNA polymerases β , δ ou ϵ vont déplacer le brin d'ADN et synthétiser 2 à 10 bases. Le brin déplacé sera ensuite excisé par l'endonucléase FEN1, et la ligase 1 ou 3 assurera la ligature du brin néosynthétisé (Robertson et al., 2009; Kim and Wilson, 2012; Krokan and Bjørås, 2013).

Il est intéressant de noter que la réplication de l'ADN peut avoir lieu avant la résolution du mésappariement U:G, ce qui aboutira à une transition G \rightarrow C ou C \rightarrow G, ou encore avant la prise en charge du site abasique, ce qui peut induire indifféremment des transitions ou des transversions. La réplication d'un site abasique ne peut être effectuée par des polymérases conventionnelles, et requiert l'action de polymérases dites « non processives », telles que Rev1 ou la pol ζ (Noia and Neuberger, 2007).

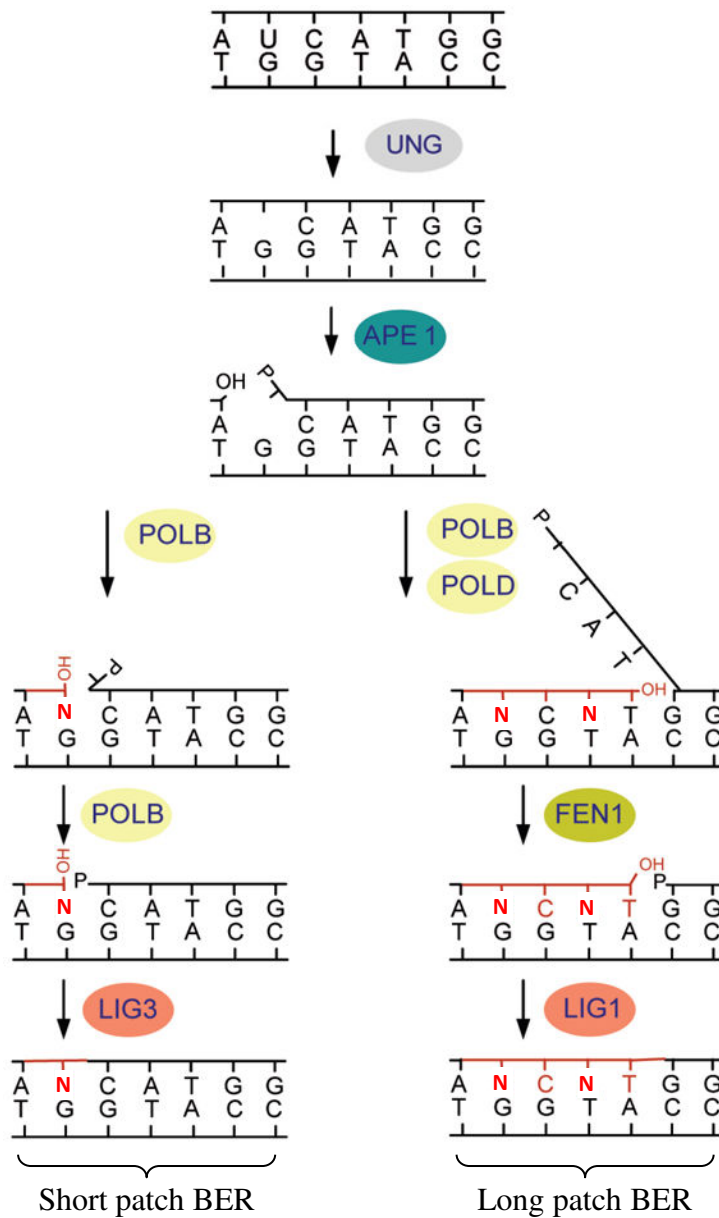


Figure 21 – Induction de mutations dans les gènes d'Ig par la voie du BER.

L'uracile créée par l'action d'AID sera excisée par UNG, créant un site abasique. Ce dernier sera détecté par APE1 qui clivera le squelette de l'ADN, générant une cassure simple brin. La réparation peut alors se faire selon deux voies : lors du « short patch » BER, une polymérase infidèle remplacera la base excisée, tandis que lors du « long patch » BER les DNA polymerases vont déplacer le brin et synthétiser 2 à 10 bases. Le brin déplacé sera ensuite excisé par FEN 1. Dans les deux cas, les fragments néosynthétisés sont ligaturés par les ligases 1 ou 3. Adapté d'après Robertson et al., 2009.

Les voies du ncBER ou ncMMR ne contribuent pas de la même façon à la SHM. En effet, puisqu'AID ne déamine que les cytosines, la voie du BER « *short patch* » n'induirait théoriquement pas de mutation au niveau des bases A et T. Inversement, les mutations générées lors de l'utilisation du MMR sont réparties de part et d'autre du site de déamination, sur l'ensemble des bases (Hwang et al., 2015). Il a été suggéré que le « *long patch* » BER puisse également induire des mutations au niveau des bases A/T, mais des analyses sur des souris UNG déficientes n'ont pas montré de diminution de la fréquence de mutation sur ces bases. Inversement, la délétion de protéines de la voie du MMR (MSH2, MSH6 ou Exo1) provoquera une baisse de 80 à 90% des mutations touchant les bases A/T (Rada et al., 1998; Wiesendanger et al., 2000; Rada et al., 2002b; Bardwell et al., 2004).

Ces données suggèrent que la voie du MMR est la voie majoritairement utilisée lors de la SHM, notamment pour les bases A/T, dans lesquelles la voie du BER n'intervient que de façon minoritaire (Martin et al., 2015). Deux études récentes suggèrent cependant que ces deux voies ne seraient pas directement en compétition, mais agiraient plutôt en coopération. Ainsi, lors de la re-synthèse du brin lors d'une réparation par le MMR, la polymérase peut rencontrer un site abasique généré par le BER sur le brin opposé, dont la réparation sera alors assurée par le MMR, induisant potentiellement des mutations sur les bases A/T (Frieder et al., 2009; Krijger et al., 2009).

L'hypermutation somatique met donc en jeu des mécanismes dérivés des voies classiques de réparation de l'ADN permettant l'induction de mutations à une fréquence élevée. Si ces mécanismes sont aujourd'hui bien connus, il reste encore à éclaircir comment l'usage de ces voies « non canoniques » est restreint aux loci d'Ig de lymphocytes B activés.

2 Induction de cassures doubles brins et réparation lors de la CSR

La CSR peut être divisée en deux étapes distinctes : -1- la génération de cassures double brin (DSB, pour *Double Strand Break*) dans les régions *switchs* (une région donneuse, qui est toujours S_μ et une région S_x dite acceptrice) et -2- la réparation de ces cassures, qui permettra le remplacement de C_μ par les exons C_x et donc l'expression d'une Ig d'isotype différent, tandis que l'ADN compris entre les deux cassures sera circularisé puis éliminé (Xu et al., 2012b).

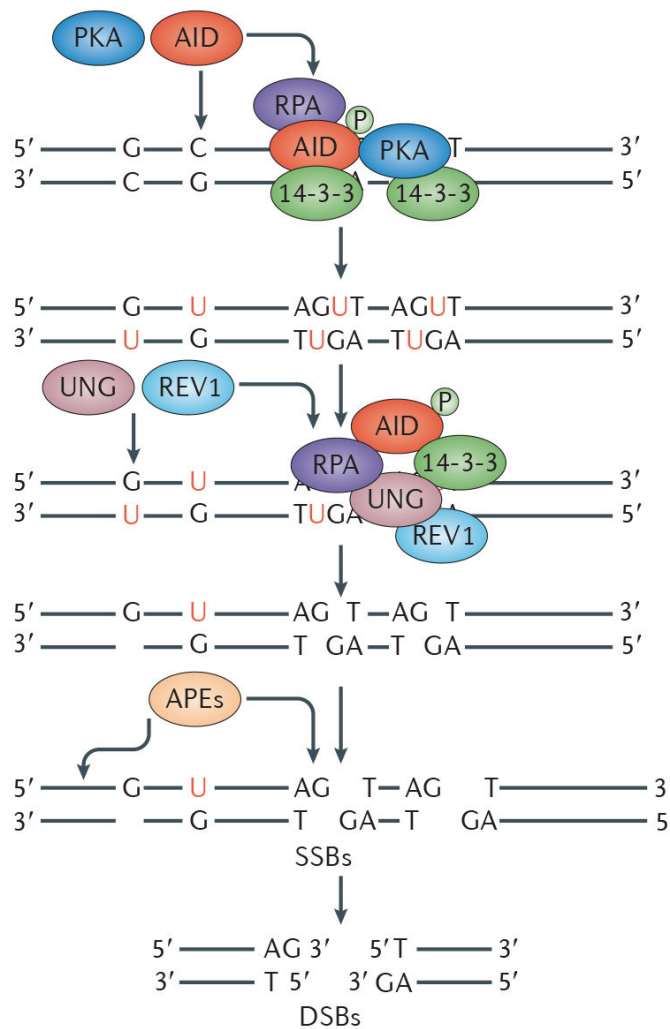


Figure 22 – Génération de cassures doubles brins lors de la CSR.

L'action d'AID va générer des mésappariements dU:G qui seront convertis en sites abasiques par UNG. Ces sites abasiques seront pris en charge par des exonucléases, dont APE1, induisant des cassures simples brins. La formation de plusieurs cassures simples brins à proximité et sur les deux brins provoquera l'apparition de DSB. Adapté d'après Xu et al., 2012

La première étape se déroule de façon similaire à la SHM : le mésappariement créé par la déamination d'une cytosine par AID sera pris en charge par les voies du ncBER et ncMMR, ce qui aboutira à l'induction de cassures simples brins (SSB, pour *Single Strand Break*). Cependant, contrairement à la SHM, la CSR requiert la conversion de ces SSB en DSB. Le mécanisme permettant cette différence est encore mal identifié, mais l'hypothèse qui prévaut actuellement est que la grande densité de cibles d'AID présentes dans les régions *switchs* permet d'obtenir simultanément des SSB sur les deux brins, assez proches pour être converties en DSB lors de leur résolution par le BER ou le MMR (**Fig. 22**) (Hackney et al., 2009; Meng et al., 2015). Les étapes suivantes seront spécifiques de la CSR, et comprennent la prise en charge des cassures doubles brins par les machineries de surveillance de l'ADN, la formation d'une « synapse » entre les deux régions *switchs* ciblées, et la réparation des cassures.

2.a Prise en charge des DSB et formation de la synapse

AID étant capable de déaminer simultanément plusieurs sites dans la même région *switch*, les DSB générées peuvent produire différents produits de recombinaison. En effet, si la CSR nécessite la réparation d'une cassure dans $S\mu$ sur une région *switch* en aval, les DSB peuvent également être réparées sur elle-même, ou sur une cassure localisée sur la même région *switch*, générant des délétions intra-*switch* (ISD, pour intra-*switch* deletion) (Boboila et al., 2010a; Alt et al., 2013).

Il existe donc une compétition entre la CSR productive et les ISD. La fréquence élevée de CSR dans les lymphocytes B activés, malgré la distance entre $S\mu$ et les autres régions *switch* (60 à 160kb) suggère l'existence de mécanismes favorisant les interactions longues distances au dépend des réparations intra-*switchs* (Zarrin et al., 2007a). Contrairement à ce qui se passe lors des recombinaisons VDJ, lors desquelles le complexe RAG ne peut cliver l'ADN que lorsque deux régions RSS forment une synapse, AID est capable d'induire des DSB dans les régions *switchs* sans qu'elles n'interagissent entre elles (Dudley et al., 2002). L'hypothèse qui prévaut aujourd'hui pour expliquer l'efficacité de ces recombinaisons à longues distances suggère que le locus adopte, grâce aux promoteurs I et à ses régions cis-régulatrices, une conformation 3D adaptée dans laquelle les régions *switchs* donneuses et

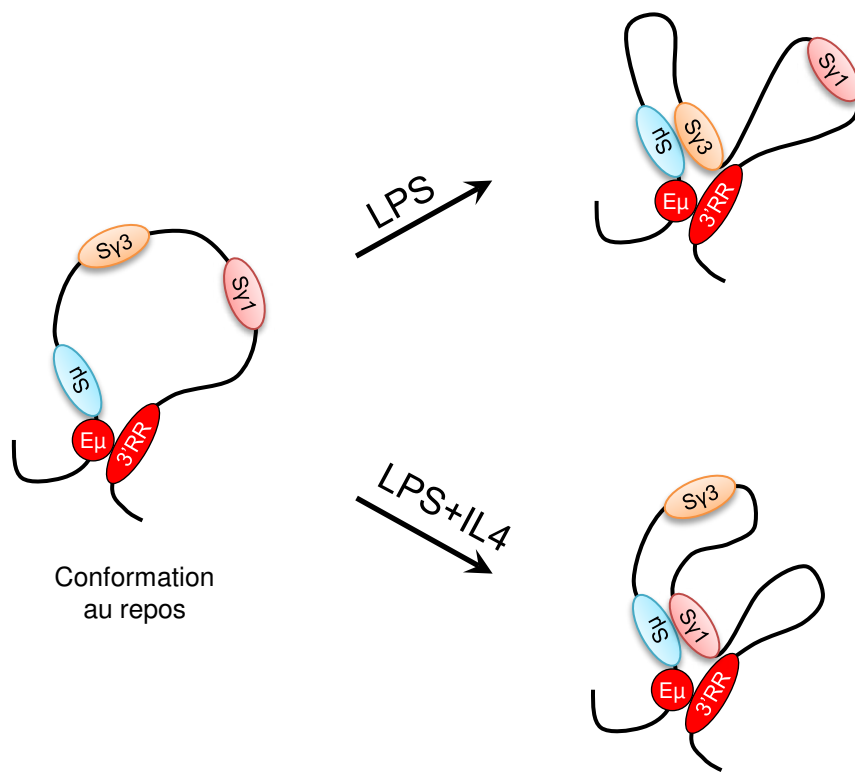


Figure 23 – Représentation schématique de la conformation 3D du locus IgH lors de la CSR.
 Dans les cellules B au repos, Eμ, la 3'RR et la région Sμ sont maintenus à proximité. Après stimulation, la région *switch* activée sera rapprochée pour favoriser les recombinaisons avec Sμ.
 Adapté d'après Wuerffel et al., 2007

acceptrices sont maintenues à proximité l'une de l'autre (**Fig. 23**) (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007; Kenter et al., 2012).

Différents modèles ont été créés, dans lesquels les régions S μ et/ou S γ 1 ont été remplacées par un site de clivage par la méganucléase de levure I-SceI. Il a ainsi été démontré que la CSR pouvait avoir lieu à une fréquence proche de celle des souris *Wt* lorsque les cassures sont induites de façon AID-indépendante. Des résultats similaires ont été obtenus dans des lignées de souris déficientes pour AID (Zarrin et al., 2007b; Gostissa et al., 2014). Ces données suggèrent que les réparations longues distance observées lors de la CSR ne dépendent ni d'AID, ni de la séquence des régions switchs, mais seraient plutôt permises par les mécanismes ubiquitaires de réparation des DSB chez les mammifères. Cette hypothèse est appuyée par le fait que des recombinaisons longues distances similaires ont pu être induites entre deux cassettes I-SceI au sein du locus IgH dans des lymphocytes T, ou encore entre le locus IgH et le locus c-myc (Gostissa et al., 2014). De même, l'analyse des translocations sur l'ensemble du génome de cellules pro-B a montré que les recombinaisons entre deux loci du même chromosome à une distance allant jusqu'à 1Mb étaient beaucoup plus fréquentes que pour des loci plus distants (Zhang et al., 2012). Toutes ces données confirment que les réparations de DSB séparées de plusieurs centaines de kb sont efficacement réparées par des mécanismes qui ne sont pas spécifiques de la CSR, mais plutôt communs à toutes les cellules chez les mammifères.

La voie de réponse aux dommages de l'ADN (ou DDR pathway, pour DNA Damage Repair pathway) dépendante d'ATM semble être l'élément clé de ces réparations longues distances. Le complexe protéique MRN (MRE11-RAD50-NBS1) va détecter les DSB et s'y fixer, avant de recruter la protéine kinase ATM. ATM va alors phosphoryler NBS1 au sein du complexe MRN et recruter d'autres protéines facilitant la prise en charge des DSB, dont notamment p53, 53BP1 (p53 Binding Protein 1) et l'histone H2AX (Lee and Paull, 2007; Hwang et al., 2015). Les protéines recrutées par la voie dépendante d'ATM vont former des foci pouvant s'étendre sur plusieurs mégabases de part et d'autre du site de cassure, soit une distance suffisamment importante pour qu'un seul foci recouvre simultanément les DSB dans les régions donneuses et acceptrices (Rogakou et al., 1999; Bassing and Alt, 2004).

En accord avec le rôle de cette voie de DDR dépendante d'ATM à la fois dans la CSR et dans le maintien de la stabilité du génome, la délétion des protéines ATM, H2AX ou 53BP1 provoque une diminution de la CSR et une augmentation de la fréquence des DSB et

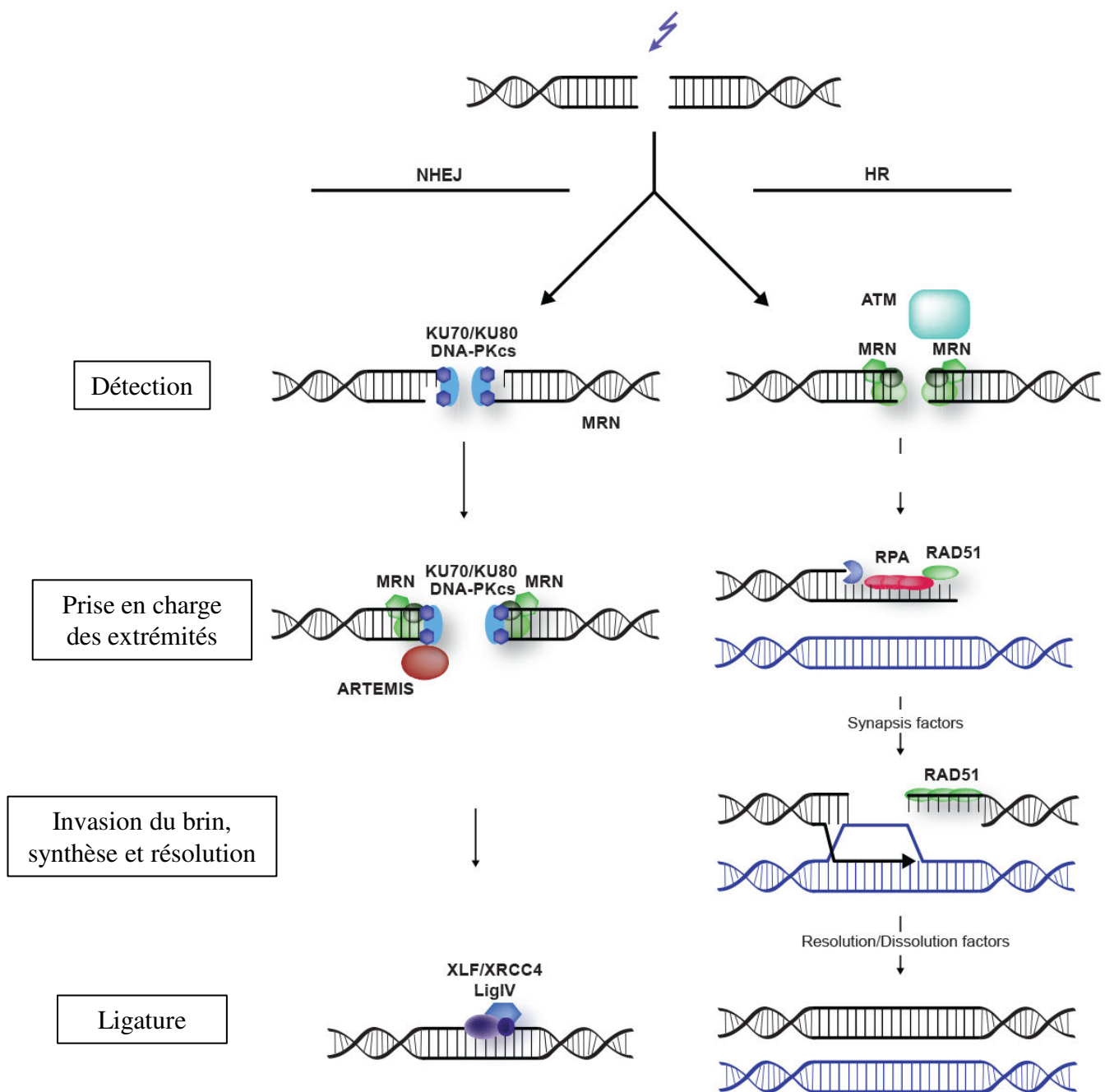


Figure 24 – Représentation schématique des voies de réparations majeures chez les mammifères.

La recombinaison homologue (HR) requiert de longs fragments homologues. Elle intervient principalement après la réplication de l'ADN. La voie du NHEJ ne nécessite pas d'homologie et peut fonctionner tout au long du cycle cellulaire. D'après Lans et al., 2012

des translocations AID-dépendantes (Reina-San-Martin et al., 2003, 2004; Manis et al., 2004; Lumsden et al., 2004; Franco et al., 2006; Ramiro et al., 2006). Parmi les différents substrats d'ATM, 53BP1 semble être le plus spécialisé, et le plus important lors de la CSR. En effet, outre la réduction très marquée de la CSR, la délétion de 53BP1 provoque une accumulation de DSB et de translocations touchant principalement le locus IgH, contrairement aux délétions des autres protéines de la voie de réparation qui induisent ces lésions sur l'ensemble du génome (Manis et al., 2004; Ward et al., 2004; Ramiro et al., 2006).

Il est intéressant de noter que si les délétions de H2AX et 53BP1 diminuent la fréquence de recombinaisons longues distances nécessaires à la CSR, elles n'affectent pas la fréquence de recombinaisons intra-switch. Il a donc été suggéré que ces protéines agissent d'une part en stabilisant l'extrémité des DSB pour limiter leur résection, et d'autre part en favorisant les recombinaisons à longues distances (Reina-San-Martin et al., 2003; Difilippantonio et al., 2008; Bothmer et al., 2011). D'autres éléments, connus pour faciliter les interactions à longues distances ont été identifiés comme jouant un rôle dans la CSR. On peut notamment citer les protéines YY1, ou le complexe cohesin qui ont été identifiés comme interagissant physiquement avec AID, et dont la délétion perturbe la CSR (Zaprazna and Atchison, 2012; Thomas-Claudepierre et al., 2013; Atchison, 2014).

2.b Réparation des cassures doubles brins : voies du NHEJ et de l'AEJ

Il existe deux voies majeures de réparation de l'ADN chez les mammifères : la voie du NHEJ (pour Non Homologous End Joining) et la voie de recombinaison homologue (**Fig. 24**). La recombinaison homologue est la voie principale de réparation post-réplication et requiert de longs fragments homologues, tandis que le NHEJ ne nécessite que peu ou pas d'homologie, et fonctionne tout au long du cycle cellulaire, notamment lors de la phase G1 où la recombinaison homologue est inactive (Alt et al., 2013; Matthews et al., 2014a).

Le fait que la majorité des DSB induites lors de la CSR aient lieu lors de la phase G1 suggère que la voie du NHEJ soit la voie de réparation majoritaire lors de cette recombinaison. Ceci a été confirmé par l'étude de modèles murins déficients pour des protéines clés de cette voie, dans lesquels la CSR est fortement diminuée. Cependant, l'existence d'une CSR résiduelle (20 à 40% du taux normal) dans ces mêmes modèles à

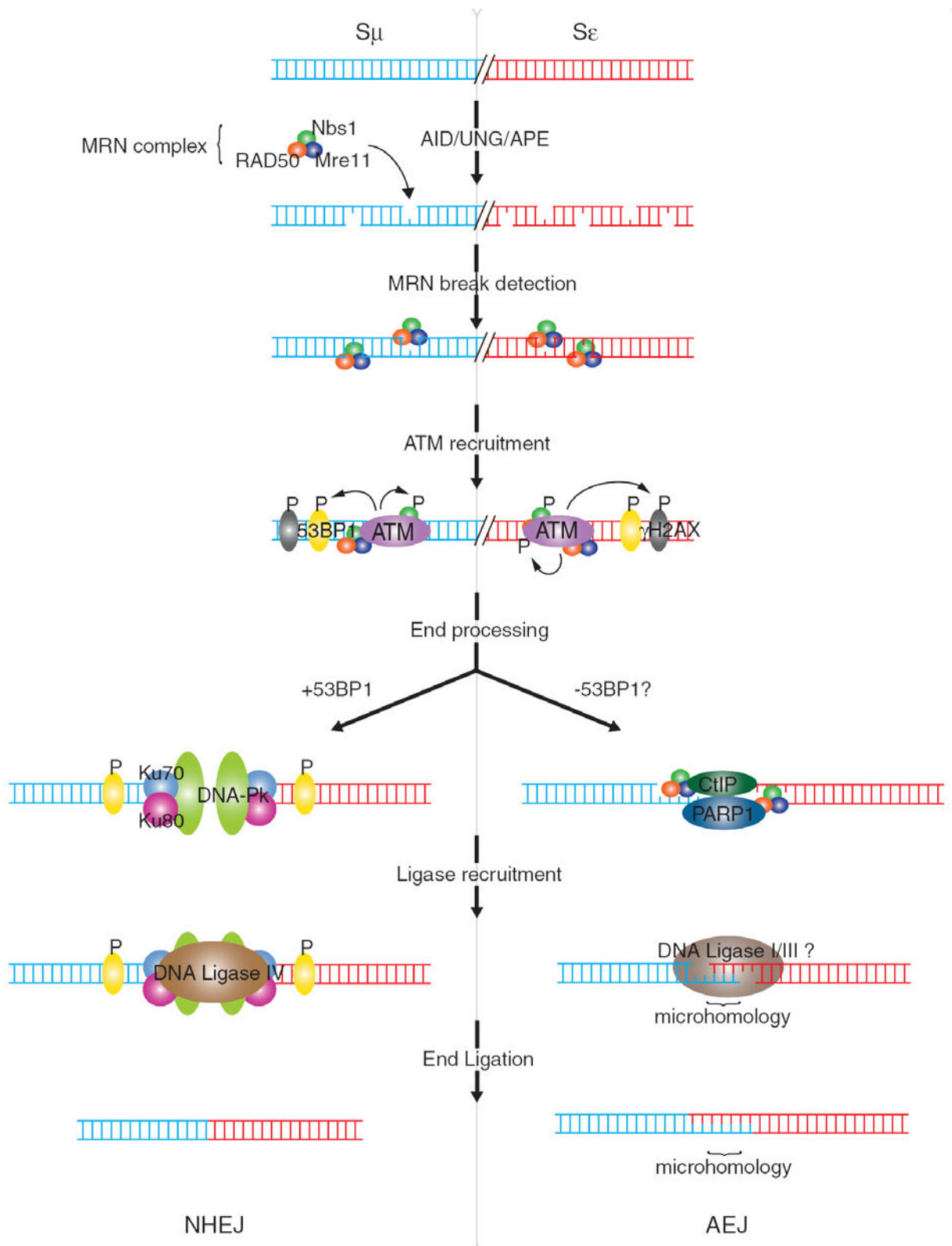


Figure 25 - Voies de réparation de l'ADN impliquées dans la CSR.

La réparation des DSB lors de la CSR peut faire intervenir la voie du NHEJ ou de l'AEJ. Lors du NHEJ, les extrémités sont prises en charge notamment par Ku70, Ku80 et DNA-PKcs, avant d'être ligaturées par la DNA ligase 4. La voie de l'AEJ fait intervenir les protéines CtIP et PARP1. La ligature est assurée par les DNA ligases 1 ou 3. D'après Fear, 2013.

permis l'identification d'une voie de réparation alternative : la voie de l'AEJ (Alternative End-Joining) (Boboila et al., 2012; Matthews et al., 2014a).

2.b.i Voie du NHEJ

La voie du NHEJ est la voie utilisée pour la réparation des DSB induites par les enzymes RAG lors des recombinaisons V(D)J. La plupart des éléments impliqués ont donc été identifiés lors de l'étude de ce mécanisme (Taccioli et al., 1993). Les principales protéines intervenant lors de la réaction de NHEJ sont Ku70, Ku80, XRCC4 et la ligase 4. Les protéines Ku70 et 80 vont se fixer au niveau des extrémités des DSB et recruter d'autres protéines dont le complexe XRCC4/Lig4 qui assurera la ligation des deux extrémités (Lieber, 2010; Boboila et al., 2012). Les protéines Ku vont également permettre le recrutement de DNA-PKcs (DNA-Dependant Protein Kinase catalytic subunit), qui va d'une part contribuer au maintien de la synapse entre les régions switches, et d'autre part recruter d'autres facteurs dont notamment l'endonucléase Artemis, qui permet la résection de certaines extrémités avant leur ligation (**Fig. 25**) (Meek et al., 2004; Meng et al., 2015).

Puisque les réarrangements VDJ, et donc les stades précoces du développement lymphocytaire B sont strictement dépendants de la voie du NHEJ, l'étude du rôle de ce mécanisme lors des phases tardives a nécessité la création de modèles murins particuliers (Nussenzweig et al., 1996; Gu et al., 1997; Gao et al., 1998; Frank et al., 1998). Différentes stratégies ont été utilisées pour contourner ce problème et déterminer l'impact de la délétion des protéines du NHEJ lors de la CSR : soit l'utilisation de souris portant des régions variables IgH et IgL pré-réarrangées, soit des modèles de délétions inductibles (Soulas-Sprauel et al., 2007; Yan et al., 2007). Dans tous ces modèles, malgré un blocage complet du NHEJ, on observe une CSR résiduelle pouvant atteindre 40% du niveau normal, ce qui démontre que, contrairement aux recombinaisons V(D)J, la CSR implique une ou plusieurs autres voies de réparations (Boboila et al., 2010b). D'autre part, la délétion des protéines DNA-PKcs et Artemis a un effet plus modéré sur la CSR, en cohérence avec l'hypothèse selon laquelle elles n'agissent que sur certains types de DSB (Bosma et al., 2002; Cook et al., 2003; Kiefer et al., 2007; Franco et al., 2008).

2.b.ii Voie de l'AEJ

Les premières preuves de l'existence de l'AEJ sont venues d'études ayant montré que les levures, puis des lignées cellulaires de mammifères déficientes pour le NHEJ sont capables de réparer des plasmides linéarisés (Boulton and Jackson, 1996; Kabotyanski et al., 1998). Ces premiers résultats obtenus sur des modèles peu physiologiques ont été confirmés par la découverte de translocations dans des lymphomes pro-B de souris déficientes pour XRCC4 ou Lig4, et par la réparation de cassures induites par la méganucléase I-SceI dans des souris déficientes pour Ku80 ou XRCC4 (Zhu et al., 2002; Guirouilh-Barbat et al., 2004, 2007). Les jonctions formées lors de ces réparations NHEJ-indépendantes impliquant toutes des microhomologies, cette voie a été initialement nommée MMEJ (*pour Microhomology-Mediated End Joining*) (Ma et al., 2003). Plus tard, des études plus poussées ont montré que, quelque soit le contexte (translocation, CSR, cassures induites par I-SceI...), une portion non négligeable des réparations via cette voie alternative se fait par jonction directe et donc que les microhomologies ne sont pas un pré requis absolu pour ce mécanisme. On ignore encore si les réparations par jonction directe ou par microhomologie utilisent les mêmes mécanismes, ou sont en réalité deux voies distinctes. Il a donc été proposé que cette voie, renommée AEJ, regroupe l'ensemble des réparations de DSB indépendantes des protéines clés du NHEJ chez les mammifères (Zha et al., 2009; pour revue: Zhang et al., 2010; Boboila et al., 2012).

La voie de l'AEJ et son rôle dans la CSR sont encore mal connus. Il semble cependant qu'il existe deux mécanismes différents : une voie Ku-indépendante et une voie Lig4-indépendante. En effet, les souris déficientes pour Ku ont une CSR diminuée mais présentent moins de jonctions par micro-homologies que les souris déficientes pour XRCC4 ou lig4, tandis que les souris déficientes pour Lig4 et Ku70 possèdent des jonctions similaires à celles des souris déficientes uniquement pour Ku70 (Boboila et al., 2010b). Différentes protéines ont été identifiées jusqu'à présent comme jouant un rôle dans l'AEJ : PARP-1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1) semble intervenir lors de la reconnaissance des DSB, Mre11 et CtIP contribuent à la résection des extrémités et XRCC1 et les ligases 1 et 3 sont responsables de la ligature des deux extrémités (Pour revue : Boboila et al., 2012; Hwang et al., 2015).

La quasi-totalité des jonctions par AEJ présentent des microhomologies, contre environ 50% pour les jonctions par NHEJ. De plus, les microhomologies générées par l'AEJ sont en moyenne plus longues que par le NHEJ (Yan et al., 2007; Stavnezer and Schrader, 2014). Il est intéressant de noter que l'usage de microhomologies plus ou moins importantes

dépend également de la similarité entre les régions switchs impliquées, deux séquences proches ayant tendance à faciliter les longues microhomologies (Pan-Hammarström et al., 2005). De même, la voie de l'AEJ semble être particulièrement impliquée dans les délétions intra-switchs (ISD), grâce à la structure particulièrement répétitive des régions switchs qui facilitent les microhomologies. Les ISD peuvent ainsi être dues à la ligature de deux DSB au sein de la même région switch ou à la réparation d'une seule DSB après la résection des extrémités caractéristiques de l'AEJ (Boboila et al., 2012).

Il est difficile d'estimer la part de DSB réparées par l'AEJ dans un contexte physiologique. Les résultats des différentes études semblent s'accorder sur le fait que la voie majeure de réparation lors de la CSR est la voie du NHEJ et que la voie de l'AEJ est une voie de « secours », en cas d'impossibilité de réparer par NHEJ. La préférence pour le NHEJ peut s'expliquer par la plus grande efficacité de cette dernière lors des réarrangements à distance. D'autre part, la réparation par l'AEJ est particulièrement infidèle, notamment à cause de la résection des extrémités qu'elle impose, et semble favorable aux translocations potentiellement oncogéniques (Boboila et al., 2010a, 2012). D'autres facteurs semblent également jouer un rôle dans le choix de la voie de réparation, tel que l'intensité de la transcription, la position du locus au sein du noyau, ou encore la fréquence de déamination par AID (Cortizas et al., 2013; Aymard et al., 2014; Lemaître et al., 2014).

L'ensemble des événements géniques ayant lieu lors du développement lymphocytaire B, que ce soit les réarrangements V(D)J au stade précoce ou la CSR et la SHM au stade tardif possèdent donc tous des points communs : ils nécessitent l'induction de lésions de l'ADN, réparées par des voies plus ou moins fidèles. En conséquence, le locus IgH est particulièrement vulnérable aux translocations potentiellement oncogéniques, ce qui impose une régulation extrêmement stricte de ces mécanismes. Cette dernière sera assurée par divers éléments *cis*-régulateurs disséminés tout au long du locus, qui seront détaillés dans le chapitre suivant.

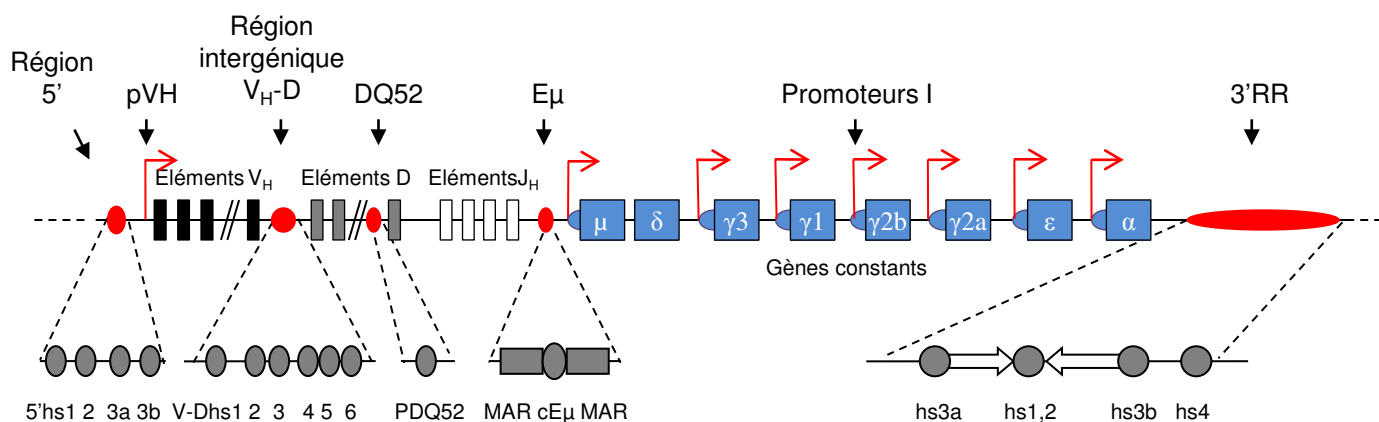


Figure 26 – Représentation schématique du locus IgH et de ses éléments régulateurs.

La ligne supérieure représente le locus IgH en conformation germinale. Les éléments régulateurs sont représentés en rouge sur la ligne supérieure, et détaillés sur la ligne inférieure. Les sites hs sont représentés par des cercles, les MARs par des rectangles et les séquences répétées inversées par des flèches blanches. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Chapitre 3: La régulation des remaniements géniques lors du développement lymphocytaire B

Les différents événements géniques qui ont lieu lors de la lymphopoïèse B requièrent une régulation extrêmement fine, à la fois dans le temps et l'espace. Leur déroulement séquentiel est assuré par différents mécanismes permettant de modifier l'accessibilité des différentes régions cibles des recombinaisons : régulation de la transcription, condensation de la chromatine, localisation des loci au sein du noyau... La coordination de ces mécanismes est assurée principalement par divers éléments cis-régulateurs répartis tout au long des loci d'Ig (**Fig. 26**) (Perlot and Alt, 2008).

Dans ce chapitre, je décrirai l'ensemble des éléments cis-régulateurs du locus IgH. La région régulatrice en 3' du locus IgH (ou 3'RR, pour 3' Regulatory Region), qui constitue le cœur de mon sujet de thèse, sera traitée de façon plus exhaustive.

I) Les promoteurs

Bien que la synthèse d'une chaîne d'Ig réarrangée ne nécessite qu'un promoteur, localisé en amont du segment V_H, il existe différents promoteurs au sein du locus IgH. Ces promoteurs seront activés séquentiellement au cours de la lymphopoïèse B, et les transcrits produits ne codent aucune protéine : on parle de transcrits germinaux stériles. Ces transcrits germinaux sont retrouvés à la fois dans les régions constantes et variables. Dès leur découverte, il a été suggéré que ces transcrits soient associés au déclenchement des événements de recombinaison géniques (Banerji et al., 1983; Yancopoulos and Alt, 1985).

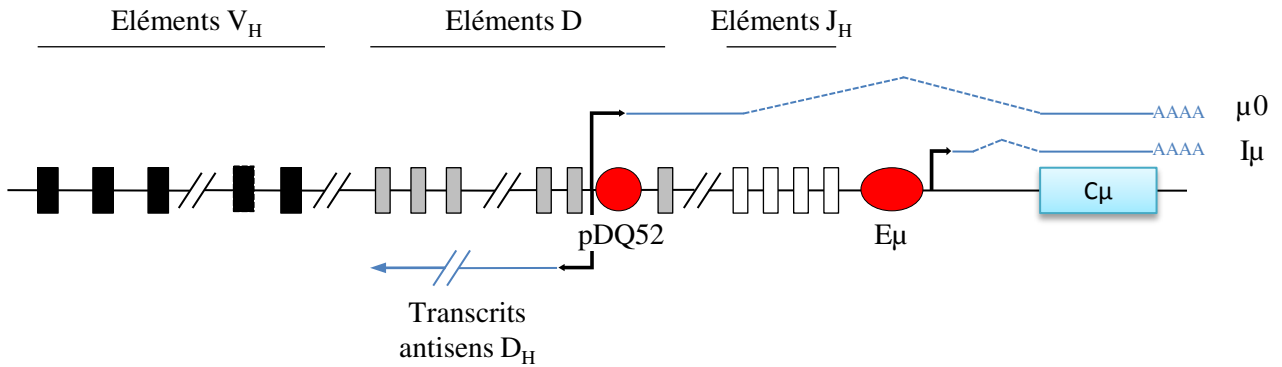
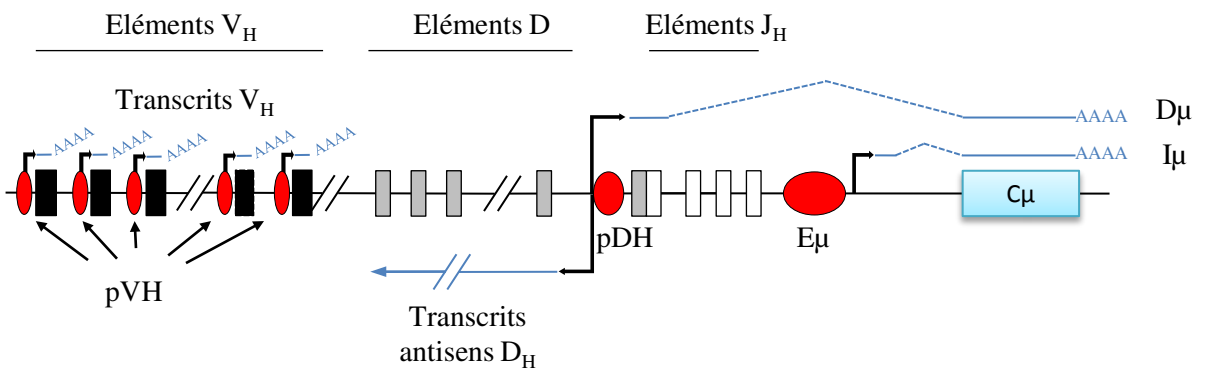
A**B**

Figure 27 – Transcrits germinaux des régions variables lors des réarrangements V_HDJ_H .

Les rectangles représentent les gènes, les cercles rouges les promoteurs et enhancers, et les traits bleus les transcrits. Lorsque le locus est en conformation germinale (**A**), des transcrits partent du promoteur pDQ52 dans les deux sens, permettant l'accèsibilité des segments D et J_H . Après les réarrangements J_H (**B**), des transcrits partent dans les deux sens à partir du promoteur du segment D réarrangé. Les segments V_H sont également transcrits à partir de leurs promoteurs respectifs.

1 La transcription germinale des régions variables

Les transcrits germinaux des régions variables représentent les transcrits des segments V_H , D et J_H avant leurs réarrangements. La transcription germinale de ces différents segments est corrélée au déroulement des différents réarrangements, cependant aucun rôle n'a encore été identifié pour ces transcrits. Il semblerait que la transcription ne serve qu'à faciliter l'accessibilité des recombinaisons à la chromatine (Sun and Storb, 2001; Sen and Oltz, 2006).

Chaque segment D, à l'exception de DQ52, contient un promoteur bidirectionnel inactif en conformation germinale qui ne sera activé qu'après le réarrangement D- J_H (Alessandrini and Desiderio, 1991; Chakraborty et al., 2007). Le segment DQ52, qui est le segment D le plus en 3', possède lui un promoteur (PDQ52) qui est actif dès les premiers stades de l'engagement dans la lignée lymphocytaire B, bien avant les premiers réarrangements. Il permet la synthèse d'un transcrit nommé μ_0 , allant du segment DQ52 au gène $C\mu$ (**Fig. 27**). Après les recombinaisons D- J_H , le promoteur du segment D réarrangé est activé et initie la transcription dans les deux sens, permettant la synthèse d'un transcrit DJ_H (Reth and Alt, 1984; Alessandrini and Desiderio, 1991; Chakraborty et al., 2007; Bolland et al., 2007).

En parallèle, après le réarrangement D- J_H , les segments V_H sont transcrits à partir de leurs promoteurs. Chaque segment V contient un promoteur qui est requis pour la transcription germinale, mais également après les réarrangements VDJ pour permettre l'expression de la chaîne d'Ig mature lors du développement lymphocytaire B (Yancopoulos and Alt, 1986). Les promoteurs V_H contiennent une TATA box et un élément initiateur (Inr), ainsi qu'un élément octamère très conservé ATGCAAAT localisé généralement à moins de 100pb du site d'initiation de la transcription (**Fig. 28**) (Parslow et al., 1984; Buchanan et al., 1997). Ces éléments octamères sont les sites de fixation des facteurs de transcription Oct-1 (ubiquitaire) et Oct-2 (spécifique de la lignée lymphocytaire B) et sont nécessaires à la transcription des segments V_H . La plupart des promoteurs V_H contiennent également une séquence heptamérique (CTCATGA) qui s'associe avec l'octamère pour activer la transcription de façon optimale et spécifique, ainsi qu'une séquence riche en pyrimidine dont la fonction est encore inconnue (Eaton and Calame, 1987).

Des séquences nommées DICE (Downstream Immunoglobulin Control Elements) ont également été identifiées juste en amont du site d'initiation de la transcription des segments

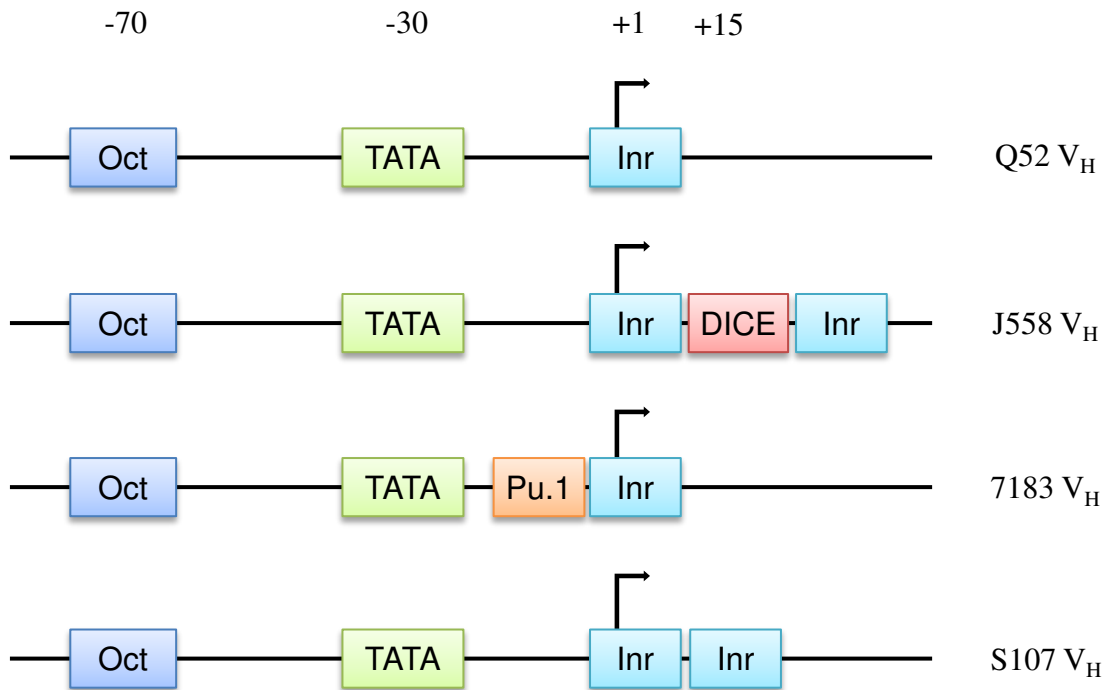


Figure 28 – Diversité et composition des promoteurs V_H .

Chaque segment V_H possède son propre promoteur. Ils sont tous caractérisés par la présence d'une séquence Oct en aval de la TATA box, ainsi qu'un élément initiateur Inr. Il existe cependant des variations selon les familles de V_H (répétition de l'élément Inr ou présence d'un site de fixation de Pu.1). D'après Roy et al., 2011.

V_H. Contrairement aux motifs octamères, ces DICE ne sont pas présents dans tous les promoteurs. De manière intéressante, ils sont le plus souvent associés aux promoteurs des segments V_H de la famille J558, qui correspondent aux promoteurs les plus actifs. Ces promoteurs possèdent une structure particulière, le DICE étant flanqué de deux éléments Inr (Buchanan et al., 1995; Tantin et al., 2004; Roy et al., 2011). Plus récemment, de nouveaux éléments ont été détectés au sein des promoteurs des segments V_H distaux. Ces éléments, nommés PAIR (Pax-5 Activated Intergenic Repeat) peuvent fixer plusieurs facteurs dont Pax-5, E2A, et CTCF. Ils semblent jouer un rôle dans la régulation des recombinaisons V_H-DJ_H (Ebert et al., 2011).

2 La transcription germinale des régions constantes

La transcription germinale des régions constantes, initiée à partir des promoteurs pI (pour *Intervening*) associés à chaque gène constant du locus IgH (excepté C δ) est nécessaire au déroulement de la CSR, comme détaillé dans le chapitre précédent. Les différents gènes C_H sont organisés en « unités transcriptionnelles », comprenant un pI inductible par une stimulation cytokinique adaptée, un exon I, une région *switch* intronique et les exons C_H. Le transcrit primaire part de l'exon I et se termine en aval des exons C_H. L'exon I sera ensuite épissé sur le premier exon C_H, supprimant la séquence intronique (**Fig. 29**) (Matthews et al., 2014a).

Bien que les transcrits ne codent aucune protéine, cette transcription est indispensable à la CSR. Outre le rôle direct de la machinerie de biosynthèse de l'ARN dans le recrutement d'AID, la transcription joue également un rôle dans le maintien d'un état chromatinien activé nécessaire à l'induction des cassures (Daniel et al., 2010). Au sein de l'unité transcriptionnel, seul le site d'épissage semble être indispensable à la CSR. En effet, le remplacement du promoteur pI par un promoteur hétérologue ne semble pas perturber la CSR vers l'isotype concerné, contrairement à la délétion du site d'épissage (Lorenz et al., 1995; Hein et al., 1998).

Après la CSR, la transcription persiste à partir du promoteur I μ , aboutissant à la synthèse d'un transcrit I μ -C α dit « hybride ». Ainsi, l'analyse des transcrits germinaux I α -C α

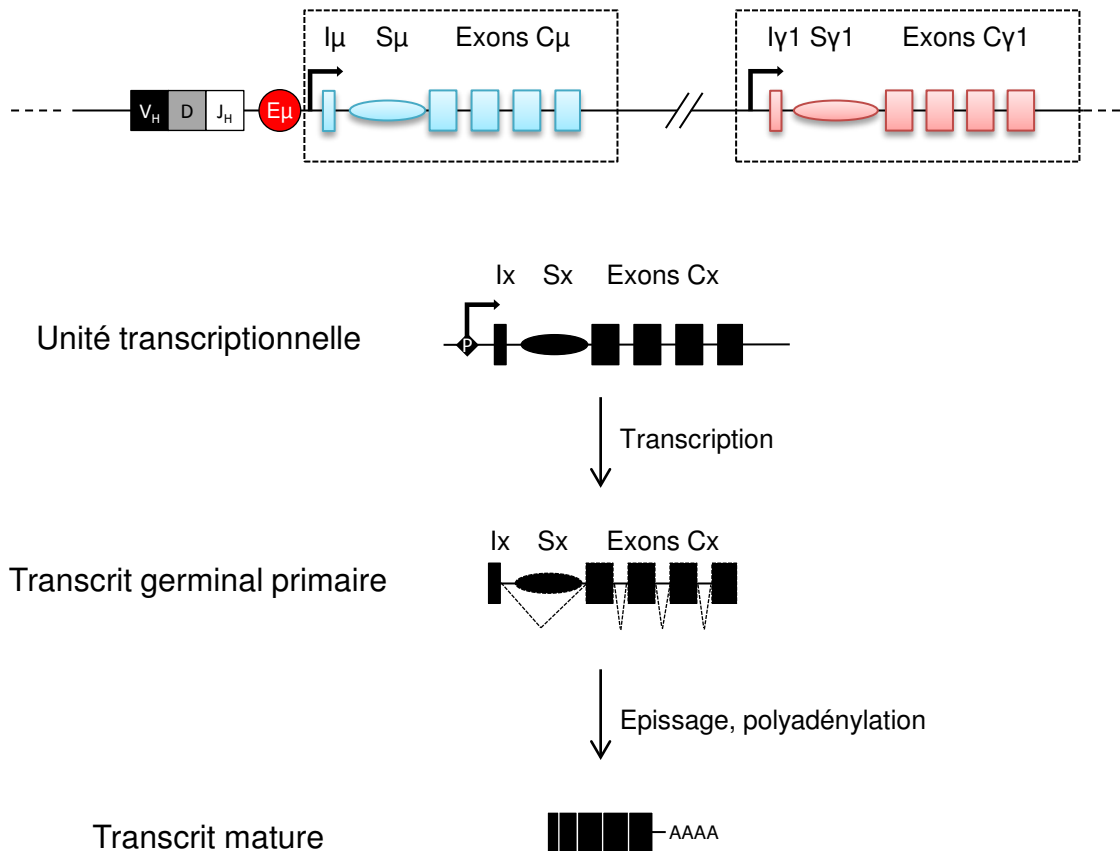


Figure 29 – Transcription germinale dans les régions constantes.

Chaque gène constant possède sa propre unité transcriptionnelle, formée d'un promoteur inductible, d'une séquence I, d'une région switch et des exons C_H . Le transcrit primaire est épissé et polyadénilé pour former un transcrit mature non codant. D'après Matthews et al., 2014

et des transcrits $I\mu$ -Cx constitue un bon outil pour étudier l'initiation et le déroulement de la CSR dans les lymphocytes B (Stavnezer, 2000; Kracker and Radbruch, 2004).

II) Les *enhancers* transcriptionnels

Un activateur transcriptionnel (ou *enhancer*) est défini comme une séquence d'ADN capable de stimuler à distance la transcription d'un gène, notamment en servant de site de fixation à des facteurs de transcriptions. Le locus IgH murin comprend deux *enhancers* : l'activateur intronique $E\mu$, localisé entre les segments J_H et le gène $C\mu$, et la région régulatrice en 3' ($3'RR$) localisée en aval de $C\alpha$.

1 L'*enhancer* intronique $E\mu$

$E\mu$ fut le premier *enhancer* découvert au sein du locus IgH (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). Sa position entre le dernier segment J_H et le gène $C\mu$ lui permet d'être maintenu lors de tous les événements de recombinaison ayant lieu au cours du développement B. D'un point de vue évolutif, il est apparu chez les tétrapodes, donc en même temps que le mécanisme de CSR. Le plus ancien *enhancer* du locus IgH, nommé $E\mu 3'$, a été identifié entre $C\mu$ et $C\delta$ chez les poissons, chez qui seule la SHM existe. Ainsi placé, l'*enhancer* aurait donc été supprimé lors de la CSR. Il a été suggéré initialement qu' $E\mu$ soit issu d'une duplication/transposition d' $E\mu 3'$, mais l'hypothèse qui prévaut actuellement est celle d'une apparition progressive d' $E\mu$, amplifiée par une pression de sélection favorisant l'émergence d'un *enhancer* maintenu tout au long du développement lymphocytaire, facilitant ainsi l'apparition de la CSR (Magor et al., 1999; Ellestad and Magor, 2005; Chaudhuri et al., 2007).

$E\mu$ est organisé sous forme d'un élément central (core $E\mu$ ou $cE\mu$) flanqué par deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR, pour *Matrix Attachment Region*) (Cockerill et al., 1987). Le core $E\mu$ contient de nombreux sites de liaison de facteurs de transcription. De 5' en 3', on distingue des sites C/EBP (CCAAT-Enhancers Binding Proteins), $\mu E1$, $\mu E5$, $\mu E2$, μA , $\mu E3$, $\mu E4$, ainsi qu'une séquence octamérique similaire à celles retrouvées à proximité des segments V_H (Ernst and Smale, 1995). La régulation d' $E\mu$ est assurée par la fixation en alternance de facteurs activateurs ou inhibiteurs de la

transcription sur $\mu E4$ et $\mu E5$. Ainsi, lorsque $E\mu$ est inactivé, dans des cellules non B par exemple, la protéine inhibitrice ZEB se fixera sur $\mu E4$ et $\mu E5$. Inversement, lors de l'activation d' $E\mu$ en prévision des réarrangements VDJ, la protéine ZEB sera remplacée par des protéines activatrices de la famille E2A (Genetta et al., 1994).

Il existe deux types de MAR : les MAR constitutives, continuellement attachées à la matrice, et les MAR facultatives, liées de façon réversible en réponse à des facteurs tissus-spécifiques. Les MAR entourant le core $E\mu$ sont des MAR facultatives : elles sont liées à des facteurs répresseurs dans les tissus non B et ne s'activent dans les cellules B qu'après fixation du facteur de transcription BRIGHT (B-cell Regulator of IgH Transcription) (Lin et al., 2007).

Le rôle d' $E\mu$ a été principalement élucidé grâce à des modèles murins porteurs de délétions totales ou partielles d' $E\mu$ et de ses MAR, dont certains ont été générés au laboratoire. La délétion d' $E\mu$ perturbe fortement les réarrangements V_HDJ_H , en inhibant la transcription sens $\mu 0$, ainsi que la transcription antisens des segments D et J_H (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993; Sakai et al., 1999; Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006; Bolland et al., 2007). En parallèle, la transcription des segments V_H semble peu dépendante d' $E\mu$: seule une légère baisse de la transcription des segments V_H proximaux a pu être détectée dans des modèles déficients pour $E\mu$. Une étude récemment publiée par notre laboratoire a démontré que malgré les défauts de transcription observés en absence d' $E\mu$, la fréquence d'utilisation des différents segments V_HDJ_H n'est pas affectée (Marquet et al., 2014).

A l'issue des réarrangements V_HDJ_H , $E\mu$ joue un rôle dans l'expression de la chaîne lourde d'Ig aux stades immatures et transitionnels. La délétion de l'enhancer provoque une diminution de cette expression qui se traduit par une baisse du nombre de lymphocytes B matures et une altération de la répartition des sous populations lymphocytaires B (Marquet et al., 2014). En revanche, au stade B mature, la délétion d' $E\mu$ n'a aucun impact ni sur le niveau d'expression du BCR, ni sur le mécanisme de SHM. Seule la CSR est diminuée, sans être complètement abolie (Bottaro et al., 1998; Li and Eckhardt, 2009; Li et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggèrent qu' $E\mu$ régule les réarrangements V_HDJ_H et le développement lymphocytaire B, via la régulation du niveau d'expression de la chaîne lourde

d'Ig, et ce depuis les stades pro-B jusqu'au stade B immature (Peng and Eckhardt, 2013; Marquet et al., 2014).

2 La région régulatrice en 3'

2.a Découverte de la 3'RR

Suite à sa découverte, E μ était considéré comme l'enhancer majeur du locus IgH, responsable de la régulation de la synthèse d'Ig. Cependant, l'identification de lignées cellulaires E μ -déficiences présentant une forte expression de la chaîne IgH a conduit les auteurs à rechercher d'autres éléments régulateurs au sein du locus (Eckhardt and Birshstein, 1985; Zaller and Eckhardt, 1985). C'est en étudiant un cosmide de rat que l'équipe de Neuberger a identifié une séquence, localisée 25kb en aval de C α , possédant un rôle d'activateur transcriptionnel, correspondant à un des *enhancers* de la 3'RR (Pettersson et al., 1990). L'homologue murin de cet activateur transcriptionnel a rapidement été identifié, et nommé initialement 3' α E, puis hs1.2 en raison de ses deux sites hypersensibles à la DNase (Dariavach et al., 1991; Lieberman et al., 1991).

Suite à la découverte de ce deuxième enhancer, différentes équipes se sont attachées à rechercher d'autres séquences possédant une activité d'activateur transcriptionnel au sein du locus, notamment grâce à des expériences de sensibilité à la DNase et/ou de systèmes rapporteurs. C'est ainsi que trois nouveaux enhancers ont été identifiés au sein de la 3'RR : C α 3'E et hs3, localisés de part et d'autre d'hs1.2, et 3' α -hs4, situé en 3' de hs3 (Giannini et al., 1993; Matthias and Baltimore, 1993; Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995). Plus tard, l'isolation d'un BAC murin contenant l'intégralité de la 3'RR, ainsi que les gènes non Ig les plus proches a permis de préciser les limites la région régulatrice (Zhou et al., 2002). Des expériences similaires ont permis de décrire les différents activateurs transcriptionnels chez l'homme (Chen and Birshstein, 1996, 1997; Pinaud et al., 1997; Mills et al., 1997).

Quatre activateurs transcriptionnels, répartis sur environ 30kb, ont donc été identifiés. Saleque a proposé en 1997 une nomenclature qui a depuis été adoptée. La région régulatrice a donc pris le nom de 3'RR et les *enhancers* sont nommés, de 5' en 3' : hs3a (anciennement

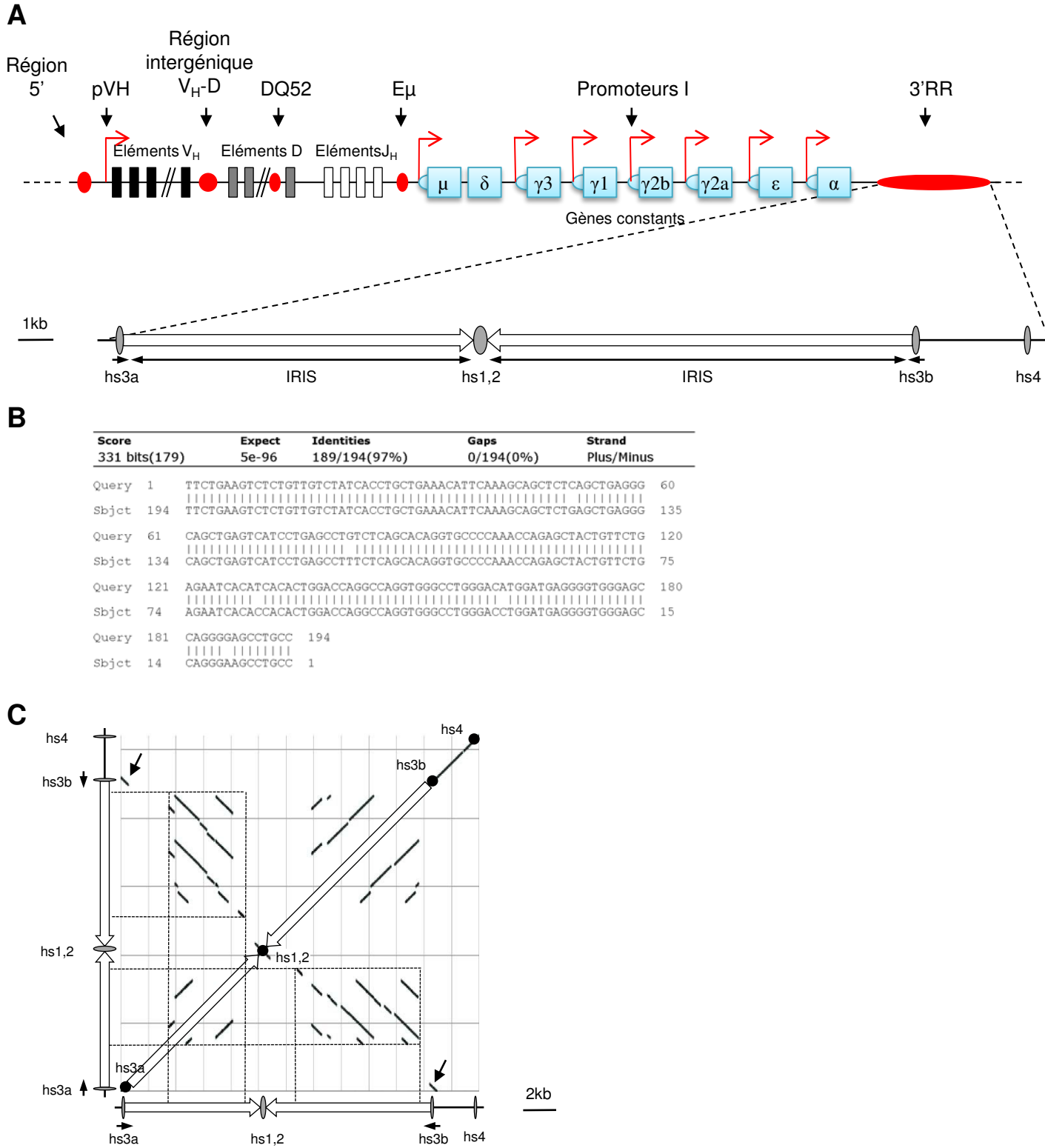


Figure 30 – Structure de la 3'RR.
(A) Représentation du locus IgH, et de la 3'RR à l'échelle. **(B)** Alignement des séquences d'hs3a et hs3b, montrant une homologie quasi-complète (97%) entre les deux enhancers. **(C)** Alignement de la séquence de la 3'RR sur elle-même, représenté sous forme de Dot-plot. La diagonale représente l'alignement de la séquence sur elle-même, les lignes qui lui sont parallèles correspondent aux séquences répétées (tandem repeats), les lignes qui lui sont perpendiculaires aux séquences répétées inversées (palindromiques).

C α 3'E), hs1.2 (anciennement 3' α E), hs3b (anciennement hs3) et hs4 (anciennement 3' α -hs4) (Saleque et al., 1997).

2.b Structure et évolution de la 3'RR

Le séquençage de la 3'RR a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques structurales. Sa spécificité principale est son architecture palindromique qui couvre les trois premiers activateurs transcriptionnels, soit environ 25kb (**Fig. 30**). En effet, hs1.2 est flanqué de deux séquences répétées inversées (IR, pour Inverted Repeat), dont certaines sont en tandem (TR pour Tandem Repeat). Les *enhancers* hs3a et hs3b forment les limites des ces séquences IR. Leurs séquences présentent 97% d'homologie, et ils sont disposés en orientation inverse, prolongeant ainsi le palindrome. L'élément hs4 se situe en dehors de celui-ci et constitue la limite 3' de la 3'RR (Chauveau and Cogné, 1996; Saleque et al., 1997). Il a été suggéré que la 3'RR soit divisée en deux unités distinctes : le palindrome et ses trois *enhancers* d'une part, et hs4 d'autre part (Pour revue : Pinaud et al., 2011; Birshstein, 2014).

Une étude plus fine réalisée au laboratoire a récemment révélé que les *enhancers* sont flanqués de séquences répétitives similaires aux régions switchs. De façon surprenante ces séquences, baptisées séquences LS (pour Like-Switch) sont ciblées par AID, ce qui permet une recombinaison $S\mu$ -3'RR similaire à la CSR. Cette recombinaison, nommée LSR (pour Locus Suicide Recombination) aboutit à la délétion de l'ensemble des gènes constants, et donc à l'apoptose des cellules B matures qui ne peuvent survivre sans exprimer de BCR (**Fig. 31**) (Péron et al., 2012).

Chez l'Homme, on retrouve également une région régulatrice en 3' qui possède certaines particularités liées à la structure du locus IgH humain. En effet, chez l'Homme les gènes constants sont dupliqués et forment deux blocs distincts séparés d'environ 30kb. Chaque bloc possède sa propre 3'RR, localisée en aval des gènes C α 1 et C α 2. Ces 3'RR ne contiennent chacune que trois *enhancers* (hs1.2, hs3 et hs4), mais présentent comme chez la souris une structure palindromique, hs1.2 étant flanqué de séquences IR (Chen and Birshstein, 1997; Saleque et al., 1997; Sepulveda et al., 2005).

De manière intéressante, les homologies de séquences sont limitées entre les espèces, tant pour les *enhancers* que pour les séquences IR, mais la structure palindromique de la 3'RR

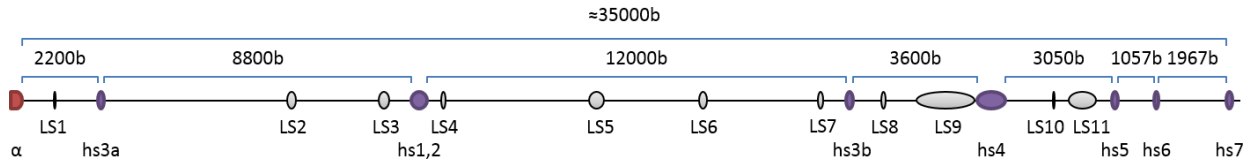
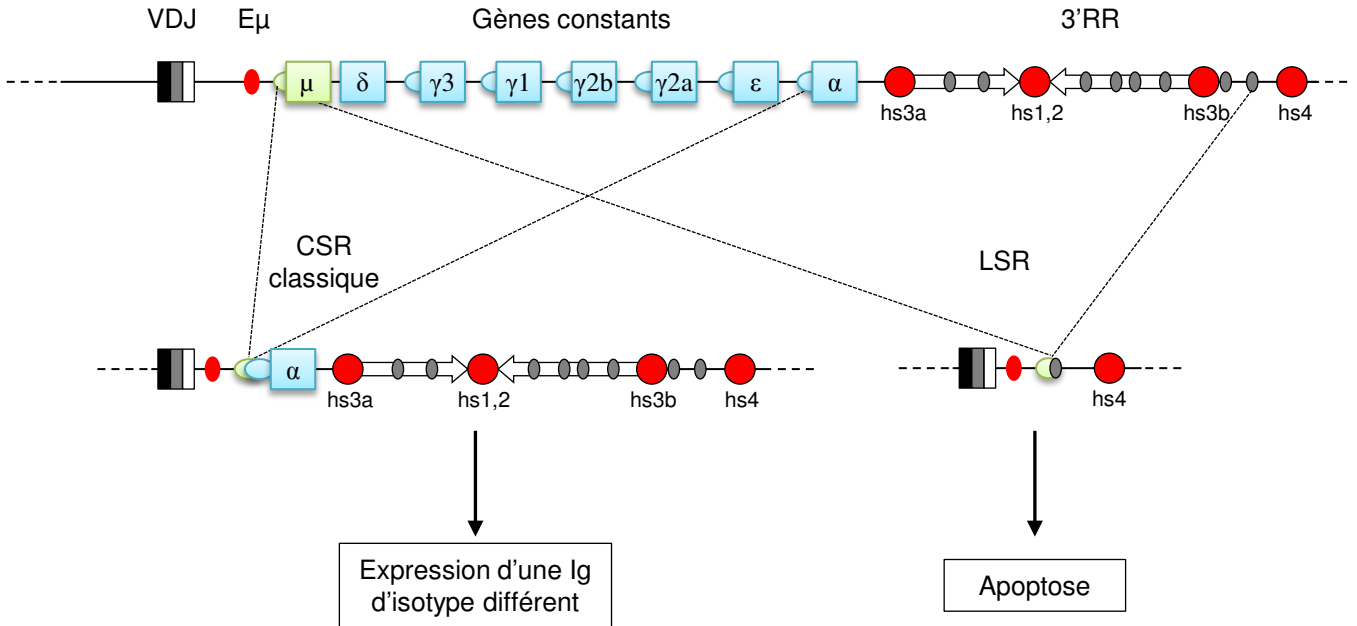
A**B**

Figure 31 – Principe de la LSR.

Au sein de la 3'RR, on trouve des séquences répétitives possédant une structure proche des régions *switchs* (A). Ces régions, nommées LS (pour *like-switch*, représentées par des cercles gris) peuvent être ciblées par AID, entraînant une recombinaison similaire à la CSR (B). Cette réaction aboutit à la délétion de l'intégralité des gènes constants, et donc à l'apoptose des cellules B matures qui ne peuvent survivre sans BCR.

est retrouvée chez tous les mammifères (D'Addabbo et al., 2011). La conservation d'une telle structure malgré le polymorphisme dans les séquences suggère une pression de sélection importante, et donc un rôle fonctionnel de cette architecture palindromique.

La 3'RR semble être l'élément régulateur apparu le plus récemment lors de l'évolution du locus IgH. Elle serait issue de la duplication de la région contenant les exons C μ qui se serait ensuite elle-même dupliquée, formant ainsi la structure palindromique. Son apparition semble corrélée à l'apparition de la CSR chez les tétrapodes. Il est donc possible que son évolution et les duplications successives aient été facilitées par une pression de sélection imposant la mise en place d'une région régulatrice assurant le contrôle de ce mécanisme complexe (Magor et al., 1999).

2.c Activité des enhancers de la 3'RR

A la suite de la découverte de la 3'RR, différentes équipes se sont attachées à découvrir ses différentes fonctions. Diverses stratégies ont été employées : l'utilisation de lignées cellulaires, de modèles transgéniques ou encore de souris déficientes pour différentes parties de la 3'RR. L'objectif est de définir le rôle de la 3'RR dans son ensemble, mais aussi celui de chaque *enhancer*, ainsi qu'une éventuelle synergie ou redondance entre ces éléments (Pour revue : Pinaud et al., 2011).

Les premières informations sur le rôle de la 3'RR ont été obtenues par des expériences de transfections de gènes rapporteurs dans des lignées cellulaires. La transfection transitoire d'hs1.2 dans une lignée de plasmocytome a démontré son rôle d'activateur transcriptionnel, avec toutefois une activité plus faible qu'E μ . Il est intéressant de noter que cet effet n'est visible que dans une lignée de plasmocytomes, mais pas de lymphomes, suggérant une fenêtre d'activité limitée au stade tardif de l'ontogénie B (Dariavach et al., 1991; Lieberson et al., 1991). De même, la transfection d'un gène rapporteur sous le contrôle d'hs3a ou hs3b a mis en évidence une activité de ces *enhancers* aux stades B mature et plasmocytaire, de l'ordre de 5 à 15% de l'activité d'E μ . Enfin, des expériences similaires ont montré une activité d'hs4 spécifiquement dans des lignées lymphocytaires B, des stades pro-B à plasmocytaire (Matthias and Baltimore, 1993; Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

La découverte successive des différents enhancers de la 3'RR a conduit plusieurs équipes à rechercher une éventuelle synergie entre ces éléments. Ainsi, ils ont pu démontrer que hs3a, hs1.2 et hs3b, inactifs au stade pré-B lorsqu'ils sont seuls, y renforcent l'activité d'hs4. De même, dans des lignées plasmocytaires ou B matures, l'activité des différents enhancers pris individuellement est faible, mais leur action synergique permet une forte stimulation de la transcription (Madisen and Groudine, 1994; Ong et al., 1998; Chauveau et al., 1998a).

Ces études ont démontré que les éléments de la 3'RR pris individuellement possèdent une activité faible. Cependant, des expériences de gènes rapporteurs ont révélé une synergie d'action entre les différents *enhancers* de la 3'RR, mais également entre ces derniers et E μ .

En effet, dans une construction où le gène C μ est placé sous le contrôle d'E μ et du promoteur pVH, l'ajout de l'enhancer hs1.2 double la transcription (Dariavach et al., 1991). Cette augmentation n'est visible que lorsqu'hs1.2 est situé en aval du gène C μ et est amplifiée lorsque la distance entre E μ et hs1.2 augmente (Mocikat et al., 1993, 1995). Cette coopération entre E μ et la 3'RR a lieu lors de tous les stades du développement B, mais uniquement lorsque les quatre *enhancers* sont présents dans leur conformation palindromique. En effet, des combinaisons incomplètes d'activateurs transcriptionnels de la 3'RR n'amplifient l'effet d'E μ que lors de certains stades de développement et peuvent même, dans certain cas, avoir un effet inhibiteur (Chauveau et al., 1998b; Ong et al., 1998).

Ces études suggèrent donc qu'au stade pré-B, seuls E μ et hs4 interviennent ; au stade B mature le « trio » hs3a, hs3b et hs1.2 devient prépondérant ; et enfin au stade plasmocytaire la présence des quatre enhancers en conformation palindromique est requise pour une transcription optimale.

En parallèle des études sur les lignées cellulaires, des modèles murins porteurs de gènes rapporteurs sous le contrôle des *enhancers* transcriptionnels de la 3'RR ont permis de préciser le rôle de cette région *in vivo*. Ainsi, deux équipes ont pu démontrer qu'hs1.2 est actif uniquement dans les lymphocytes B activés (Arulampalam et al., 1994; Andersson et al., 1999).

En 1994, Madisen et Groudine ont démontré par des expériences de transgénèse que les trois enhancers hs1.2, hs3b et hs4 liés à c-myc sont suffisant pour induire une surexpression, indépendamment du site d'intégration mais proportionnellement au nombre de

copies. Ils ont alors défini cette région comme une LCR (Locus Control Region), c'est-à-dire une région d'ADN capable de réguler l'expression de gènes qui lui sont associés, de façon tissu spécifique, proportionnelle au nombre de copie et indépendamment du site d'insertion (Madisen and Groudine, 1994; Pour revue : Li et al., 2002). Suite à ces résultats, plusieurs équipes ont développé des modèles murins dans lesquels l'expression d'un transgène est régulée par la 3'RR en conformation « mini-locus », c'est-à-dire une « mini 3'RR » dont les enhancers sont placés bout-à-bout sans les séquences qui les séparent dans sa configuration germinale.

Ces études ont confirmé la capacité de la 3'RR à activer la transcription de façon tissu-spécifique indépendamment du site d'insertion, mais cette activation ne semble pas corrélée au nombre de copies intégrées (Chauveau et al., 1999; Guglielmi et al., 2003a). Cette absence d'effet du nombre de copie serait due à l'absence dans ces constructions « mini 3'RR » de séquences particulières présentes dans la 3'RR endogène, notamment des isolateurs, et n'exclurait donc pas que la 3'RR se comporte comme une LCR dans un contexte physiologique (Guglielmi et al., 2003b, 2003c). Cependant, pour éviter toute ambiguïté, le terme de 3'LCR parfois utilisé pour désigner cette région régulatrice a été abandonné au profit de 3'RR.

2.d Régulation de l'activité de la 3'RR par des facteurs *trans*

L'activation séquentielle des différents enhancers de la 3'RR est contrôlée par un ensemble de facteurs de transcription activateurs ou répresseurs agissant en *trans*. En effet, la séquence de la 3'RR comporte de nombreux sites de fixation répartis tout au long de sa séquence, à la fois pour des facteurs spécifiques du lignage B ou pour des facteurs ubiquitaires (Pour revue : Pinaud et al., 2011).

Les enhancers hs3a et hs3b présentant 97% d'homologie de séquence possèdent des sites de liaisons similaires. Trois sites Oct ont été identifiés dans leur séquence, permettant la fixation d'Oct1 et Oct2 (Matthias and Baltimore, 1993). On distingue également des sites MARE (pour Maf Recognition Element) permettant la fixation des protéines inhibitrices Maf, SMRT et Bach2. Ces fixations aux stades précoces du développement B sont indispensables pour éviter une transcription prématurée du locus IgH (Muto et al., 1998).

Hs3a et hs3b présentent aussi plusieurs sites μ E2 et μ E5 capables de fixer les protéines de la familles E2A (Chauveau and Cogné, 1996; Greenbaum and Zhuang, 2002).

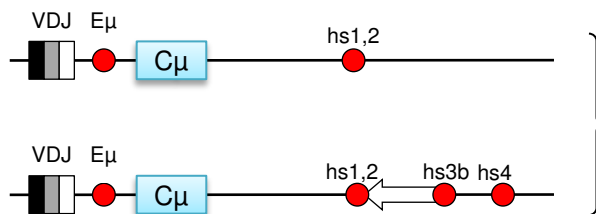
Hs1.2 présente également plusieurs sites μ E2 et μ E5 dont l'importance a été étudiée plus en détails. O'Riordan et Grossdell ont en effet démontré que les sites μ E5 d'hs1.2 fixent notamment les protéines E12 et E47, nécessaires à l'engagement dans la lignée lymphocytaire B. La fixation de ces protéines est elle-même régulée par les protéines inhibitrice Id1, Id2 et Id3 qui permettent de limiter l'activation d'hs1.2 aux stades précoces du développement B ou dans les cellules B matures au repos (Kadesch, 1992; Sun, 1994; Meyer et al., 1995; O'Riordan and Grosschedl, 1999). Hs1.2 possède également un site Oct qui permettra son activation après fixation des protéines Oct-2 et OCA-B (Tang and Sharp, 1999).

Un site de fixation pour NF κ B (site κ B) a également été décrit dans hs1.2 agissant comme répresseur aux stades précoces, puis comme activateur aux stades tardifs (Michaelson et al., 1996). Deux sites de fixation pour la protéine Pax5 (facteur clé du développement B jusqu'au stade B mature, aussi appelé BSAP) ont été identifiés dans hs1.2. Dans les cellules B au repos, Pax5 se fixe sur ces sites et interagit avec les facteurs Oct et NF κ B pour réprimer hs1.2. Lorsque l'expression de Pax5 est inhibée au stade plasmocytaire, ces interactions disparaissent ce qui permet l'activation d'hs1.2 et la synthèse optimale des chaînes lourdes d'Ig (Neurath et al., 1994, 1995; Singh and Birshstein, 1996). L'activité d'hs1.2 au stade plasmocytaire est encore renforcée par la fixation de PU.1 et d'autres facteurs de la famille ETS (Neurath et al., 1995).

L'*enhancer* hs4 est activé dès les stades précoces du développement B, sa régulation doit donc être différente des autres enhancers. Cependant, il possède des sites de fixation similaires à ces derniers, notamment un site κ B et des sites Pax5 et Oct. Le site κ B semble actif tout au long du développement B. Oct-1 active hs4 des stades pré-B à B mature tandis qu'Oct-2 agit en collaboration avec OCA-B dans les B matures activés. Enfin, Pax5 semble posséder un double rôle : il interagit au stade précoce avec des complexes inhibiteurs mais activerait hs4 à partir des stades B matures (Wakatsuki et al., 1994; Michaelson et al., 1996; Tang and Sharp, 1999).

En parallèle de ces régulations, l'équipe de Sulentic a démontré que l'activité de la 3'RR peut être régulée in vitro par différents agents chimiques (Henseler et al., 2009). D'autre part, il a été démontré que la 3'RR peut recruter l'histone déacétylase 1 (HDAC1). La

Transgènes « SHM »

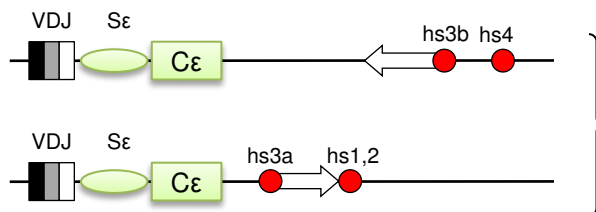


Hs3b et hs4 augmentent la SHM dans le transgène

Référence

Terauchi et *al.*, 2001

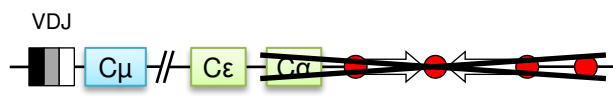
Transgènes « CSR »



Hs3b et hs4 recrutent la machinerie de CSR et SHM dans le transgène

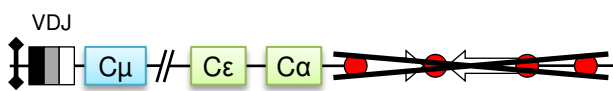
Laurencikienė et *al.*, 2007

Transgènes BAC



Peu d'effet sur l'expression d'IgM, diminution de la transcription germinale et de la CSR vers les gènes γ

Dunnick et *al.*, 2005



Diminution de la CSR et de la sécrétion pour tous les isotypes, diminution de la SHM, baisse de l'expression d'IgM

Dunnick et *al.*, 2009

Figure 32 – Modèles de transgénèse utilisés pour l'étude du rôle de la 3'RR.

Différents modèles de transgénèse ont été utilisés pour étudier le rôle de la 3'RR lors de la lymphopoïèse B, et plus particulièrement lors des recombinaisons secondaires. Ils reposent sur la transfection de cassettes contenant tout ou partie du locus IgH, ainsi que la 3'RR complète ou tronquée.

surexpression transitoire de l'HDAC1 entraîne une augmentation de l'activité d'E μ et des enhancers de la 3'RR tandis qu'un traitement par des inhibiteurs chimiques (HDACi), dont certains sont déjà utilisés en thérapeutique, diminue l'activité de la 3'RR et donc la transcription du locus IgH (Lu et al., 2005; Waibel et al., 2015).

2.e Role de la 3'RR dans l'ontogénie B

Les études décrites précédemment ont permis d'établir que la 3'RR, grâce à l'action synergique de ses *enhancers* transcriptionnels, joue un rôle dans les phases tardives de l'ontogénie B. Suite à ces découvertes, les auteurs ont souhaité déterminer si lors de ces phases tardives, la 3'RR est importante pour les mécanismes de CSR et de SHM. Pour répondre à ces questions, divers modèles de transgénèse ou de KO ont été créés (**Fig. 32**) (Pinaud et al., 2011).

Les premières preuves de l'implication de la 3'RR lors de la SHM ont été obtenues par l'équipe de Terauchi, grâce à la transfection d'un système rapporteur dans des souris chimériques. Le transgène contenait un promoteur pV_H, un segment VDJ réarrangé, l'enhancer E μ et les exons C μ , suivis ou non par des éléments de la 3'RR. Les auteurs ont ainsi pu démontrer que la présence des enhancers hs1.2, hs3b et hs4 en aval de C μ permet une forte augmentation de la fréquence de SHM dans le transgène (Terauchi et al., 2001). En utilisant une stratégie similaire, Laurencikienė et al ont démontré que la présence des enhancers hs3b et hs4 est suffisante pour permettre le recrutement de la machinerie de CSR sur la région S ϵ (Laurencikienė et al., 2007).

L'équipe de Dunnick s'est spécialisée dans la création de modèles murins transfectés par des BAC contenant un VDJ réarrangé, E μ et l'intégralité des gènes constants. En délétant la 3'RR dans ces BAC, ils ont pu démontrer que la 3'RR est indispensable pour la CSR, la SHM, l'expression du BCR à la surface et la sécrétion d'Ig (Dunnick et al., 2005, 2009). Ces modèles sont informatifs, mais ne sont pas nécessairement représentatifs de ce qui se passe dans un contexte endogène puisque les résultats peuvent varier notamment selon le site d'insertion des transgènes. Pour s'affranchir de ces biais, la stratégie la plus efficace est d'étudier les effets de la délétion des différents éléments de la 3'RR endogène.

		SHM	CSR	Synthèse d'Ig	Références
Souris <i>Wt</i>					
<i>Δhs3a</i> mice		Non touchée	Non touchée	Non touchée	Manis et al., 1998
Souris <i>Δhs1,2</i>		Non touchée	Non touchée	Non touchée	Manis et al., 1998
Souris <i>Δhs3b</i>		Non touchée	Non touchée	Non touchée	Bébin et al., 2010
Souris <i>Δhs4</i>		Non touchée	Non touchée	Non touchée	Vincent-Fabert et al., 2009
Souris <i>Δhs3b/hs4</i>		Non touchée	↓↓↓ (sauf Ig1)	↓↓↓	Pinaud et al., 2001 Le Morvan et al., 2003
Souris <i>Δ3'RR</i>		?	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Vincent-Fabert et al., 2010

Figure 33 – Modèle murin de délétion de la 3’RR.

Différents modèles murins de délétions de la 3’RR ont été générés et analysés. La délétion d’un seul *enhancer* n’a que peu ou pas d’effet, confirmant la redondance et la synergie d’activité entre les différents éléments de la 3’RR. La délétion combinée d’hs3b et hs4, ou de l’intégralité de la 3’RR perturbe fortement la CSR et la synthèse d’Ig.

La première lignée cellulaire portant une délétion de la 3'RR fut isolée en 1986, soit avant même que la structure complète de la 3'RR ne soit connue. En effet, Gregor et Morrison ont décrit une lignée de myélome murin portant une délétion spontanée en aval de C α , dans laquelle la transcription de C α est fortement diminuée. L'analyse plus détaillée de cette lignée, quelques années plus tard, a révélé que cette baisse de transcription est due à la délétion complète de la 3'RR (Gregor and Morrison, 1986; Michaelson et al., 1995). Cependant, des délétions partielles de la 3'RR semblent n'avoir que peu d'effet. En effet, la délétion spontanée d'hs3a et hs1.2 dans une lignée pré-B n'affecte pas l'expression d'IgH, même après fusion avec des lignées de myélomes portant la mutation dans un contexte de cellules plasmatisques (Saleque et al., 1999). Le remplacement d'hs1.2 par une cassette *neo^r* dans une lignée B mature diminue la transcription. Il est cependant difficile d'imputer cette baisse à la délétion d'hs1.2, puisqu'on sait aujourd'hui que l'insertion d'une cassette *neo^r* perturbe les interactions entre les différents enhancers (on parle « d'effet *neo^r* ») (Lieberson et al., 1995; Seidl et al., 1999).

Pour définitivement élucider le rôle des différents éléments, des modèles murins de délétions de chaque *enhancers* ont été créés (**Fig. 33**). La délétion propre (dans laquelle la cassette *neo^r* est supprimée après transfection) d'un seul *enhancer* semble n'avoir que peu ou pas d'effet. Seule la délétion d'hs4 entraîne une baisse de l'expression de l'IgM membranaire (Bébin et al., 2010; Cogné et al., 1994; Manis et al., 1998; Vincent-Fabert et al., 2009a). Cette absence d'effet a renforcé l'idée d'une synergie et d'une potentielle redondance de fonctions des *enhancers*. La délétion combinée des *enhancers* hs3b et hs4 entraîne une diminution de la CSR et de la transcription germinale, une baisse de l'expression de l'IgM membranaire ainsi qu'une baisse de la synthèse des Ig (sauf IgM et IgG1). En revanche, la SHM ne semble pas affectée (Pinaud et al., 2001; Morvan et al., 2003).

En 2010, notre laboratoire a créé un modèle de délétion de l'intégralité de la 3'RR, qui a définitivement démontré que la 3'RR n'intervient pas lors des réarrangements VDJ mais est nécessaire pour la CSR et la production d'Ig membranaires ou sécrétées (Vincent-Fabert et al., 2010a; Rouaud et al., 2012a). L'étude de ce modèle a constitué une part importante de mon travail de thèse, les conclusions seront donc détaillées dans la partie « Résultats ». De même, deux nouveaux modèles ont été créés. Le premier porte la délétion des *enhancers* hs3a à hs1.2 (souris Δ leftPAL), l'autre la délétion des séquences répétées inversées localisées entre

hs3a et hs1.2 (souris ΔIRIS). L'objectif de ces nouveaux modèles est de déterminer le rôle de la structure palindromique conservée de la 3'RR.

2.f La 3'RR, un super-enhancer ?

Comme décrit précédemment, les enhancers partagent certaines caractéristiques communes : la capacité à amplifier à distance la transcription de gènes, la présence de sites de fixation de facteurs de transcription, une hypersensibilité à la DNase I, la présence de marques épigénétiques (H3K27ac...) et la capacité à former des boucles pour entrer en contact avec les gènes dont ils régulent la transcription. Différentes études principalement basées sur la technique de ChIP-seq ont permis de détecter entre 10 et 15 000 *enhancers* potentiels par type cellulaire (Pott and Lieb, 2015).

Des auteurs ont récemment suggéré l'existence d'une nouvelle classe d'*enhancers*, baptisés « *super-enhancers* ». Ces régions régulatrices, beaucoup moins nombreuses, contrôleraient l'expression d'un grand nombre de gènes et seraient nécessaire à la l'engagement des cellules pluripotentes dans les différentes lignées. Ces *super-enhancers* sont définis comme étant longs (plusieurs kb contre 700pb en moyenne pour les *enhancers* « classiques ») et fortement enrichis en facteurs de transcription, en certaines marques épigénétiques (H3K27ac, H3K4me2, H3K4me1), en histone acétyl-transférases (p300), ou encore en Med1, une protéine du complexe du médiateur participant à la formation de boucles chromatinienne (Whyte et al., 2013; Pott and Lieb, 2015). La 3'RR répond à tous ces critères et peut donc être définie comme un « *super-enhancer* ».

III) Les isolateurs

Les isolateurs (ou régions isolatrices) sont des séquences d'ADN fixant des barrières dans la chromatine. On distingue principalement deux types d'isolateurs : ceux qui séparent les activateurs transcriptionnels des promoteurs pour éviter d'éventuelles interactions indésirables, et ceux qui créent une barrière pour séparer l'euchromatine de l'hétérochromatine, et éviter la propagation de cette dernière. L'activité de ces régions isolatrices passe par la présence d'un site CCCTC (CBE, pour CTCF binding element),

permettant la fixation des protéines CTCF (CCCTC Binding Factor). Ces protéines participent à la contraction du locus et à la formation de boucles chromatinienne en interagissant entre elles ou avec d'autres protéines telle que la cohésine (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Le locus IgH comprend plusieurs isolateurs qui participent à la régulation du développement lymphocytaire B et au déroulement séquentiel des événements de recombinaisons (Degner et al., 2009; Guo et al., 2011a; Gerasimova et al., 2015).

1 La région 5'

Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse de l'existence d'un élément régulateur en 5' du locus, permettant son ancrage en périphérie du noyau et contrôlant les étapes précoces du développement B (Kosak et al., 2002; Yang et al., 2005). En accord avec cette hypothèse, quatre sites hypersensibles à la DNaseI ont été identifiés environ 30kb en amont des premiers segments J_H : 5'hs1, 5'hs2, 5'hs3a et 5'hs3b. 5'hs1 n'est détectable par cette technique qu'au stade pro-B, contrairement aux autres sites qui eux le sont tout au long du développement B. 5'hs1 peut fixer les facteurs de transcription PU.1, Pax5 et E2A, et hs2 possèdent des sites CBE (Pawlitzy et al., 2006). Ces éléments sont en faveur d'un rôle de cette région 5' dans la régulation du développement B.

Cependant, ni la délétion de 5'hs1 seul ni celle de l'intégralité de la région 5' n'ont mis en évidence de défaut du développement B, ni des réarrangements VDJ ou de la CSR. L'hypothèse qui prévaut aujourd'hui est donc que cette région 5' n'agirait pas comme un élément cis-régulateur sur le locus IgH, mais en constituerait plutôt les limites chromatinienne (Pawlitzy et al., 2006; Perlot et al., 2010).

2 La région intergénique et IGCR1

Entre les segments V_H et D, s'étend une région intergénique de plus de 90kb. Cette région, nommée région intergénique V_H-D contient six sites hypersensibles à la DNase (hs1 à 6) dont seulement deux (hs4 et hs5) contiennent des sites de fixation de facteurs de transcription essentiels au développement B (PU.1, Pax5, Stat3) et un CBE (Featherstone et al., 2010).

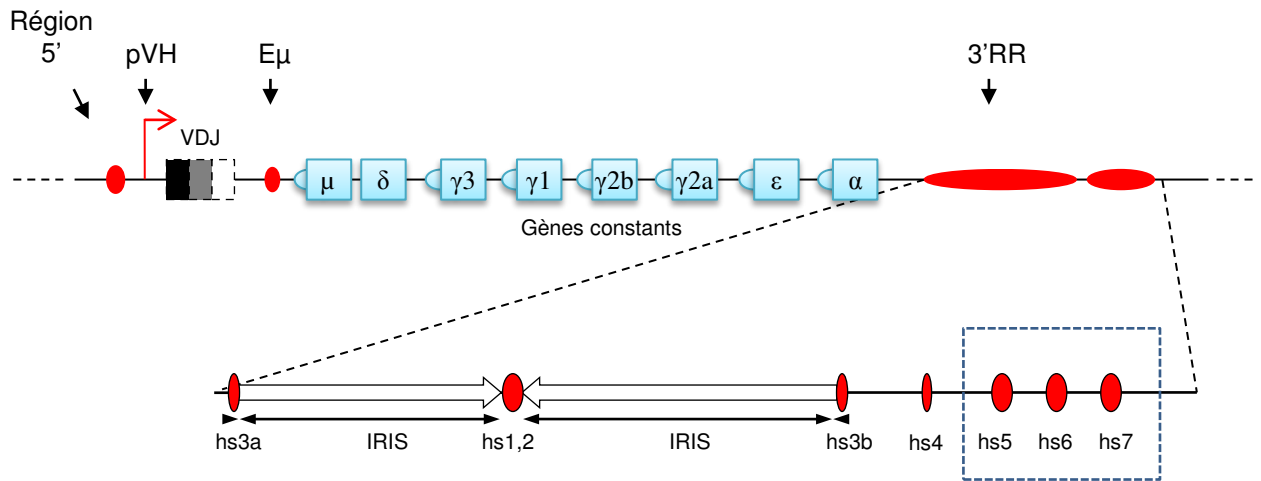


Figure 34 – Localisation des sites hs5, hs6 et hs7.

Directement en aval de la 3'RR se trouvent 3 sites d'hypersensibilité à la DNase (encadrés sur le schéma) possédant plusieurs sites CBE, notés hs5, hs6 et hs7. Ces éléments constituent la limite 3' du locus IgH et jouent principalement un rôle d'isolateur.

Le premier rôle identifié pour cette région a été celui d'isolateur entre les segments D et les segments V_H. En effet, les sites CBE qu'elle contient permettent d'empêcher à la transcription antisens des segments D de s'étendre aux segments V_H, réprimant ainsi l'accessibilité des segments V_H tant que les réarrangements D-J_H n'ont pas eu lieu. Ces isolateurs sont donc indispensables au déroulement séquentiel des réarrangements VDJ (Featherstone et al., 2010).

Plus récemment, le groupe d'Alt a défini une région d'environ 4kb contenant entre autre les deux CBE (notés CBE1 et 2) qu'ils ont renommé IGCR1 (pour InterGenic Control Region 1). Cette région assure d'une part la régulation de la transcription germinale des segments variables, et d'autre part permet la diversité du répertoire en facilitant les réarrangements des segments V_H les plus distaux via la formation de boucles chromatiniennes (Giallourakis et al., 2010; Guo et al., 2011b). Une étude récente a démontré que CBE1 et 2 agissent en synergie pour adapter l'organisation spatiale du locus IgH au cours des différentes étapes du développement B, en favorisant ou réprimant certaines interactions longue distance lors des évènements de recombinaison et ainsi assurer leurs déroulements coordonnés (Lin et al., 2015).

3 Hs5 6 7

En aval de la 3'RR, trois nouveaux sites d'hypersensibilité à la DNaseI ont été identifiés et nommés hs5, hs6 et hs7 (**Fig. 34**) (Garrett et al., 2005). L'analyse de la séquence de cette région a mis en évidence la présence de plusieurs sites CBE, lui suggérant un rôle d'isolateur. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse de souris déficientes pour cette région, dans lesquelles l'effet majeur observé est une augmentation de la transcription des gènes situés en 3' du locus IgH. Cependant, les auteurs ont également remarqué un biais dans les réarrangements VDJ, avec un usage accru des segments V_H proximaux, de DQ52 et de J_H3 (Volpi et al., 2012).

Cette région ne semble donc pas jouer un rôle de cis-régulateur mais, en accord avec la présence des sites CBE, interviendrait plutôt dans la régulation des interactions longue distance lors des évènements de recombinaisons. De plus, elle constituerait la limite 3' du

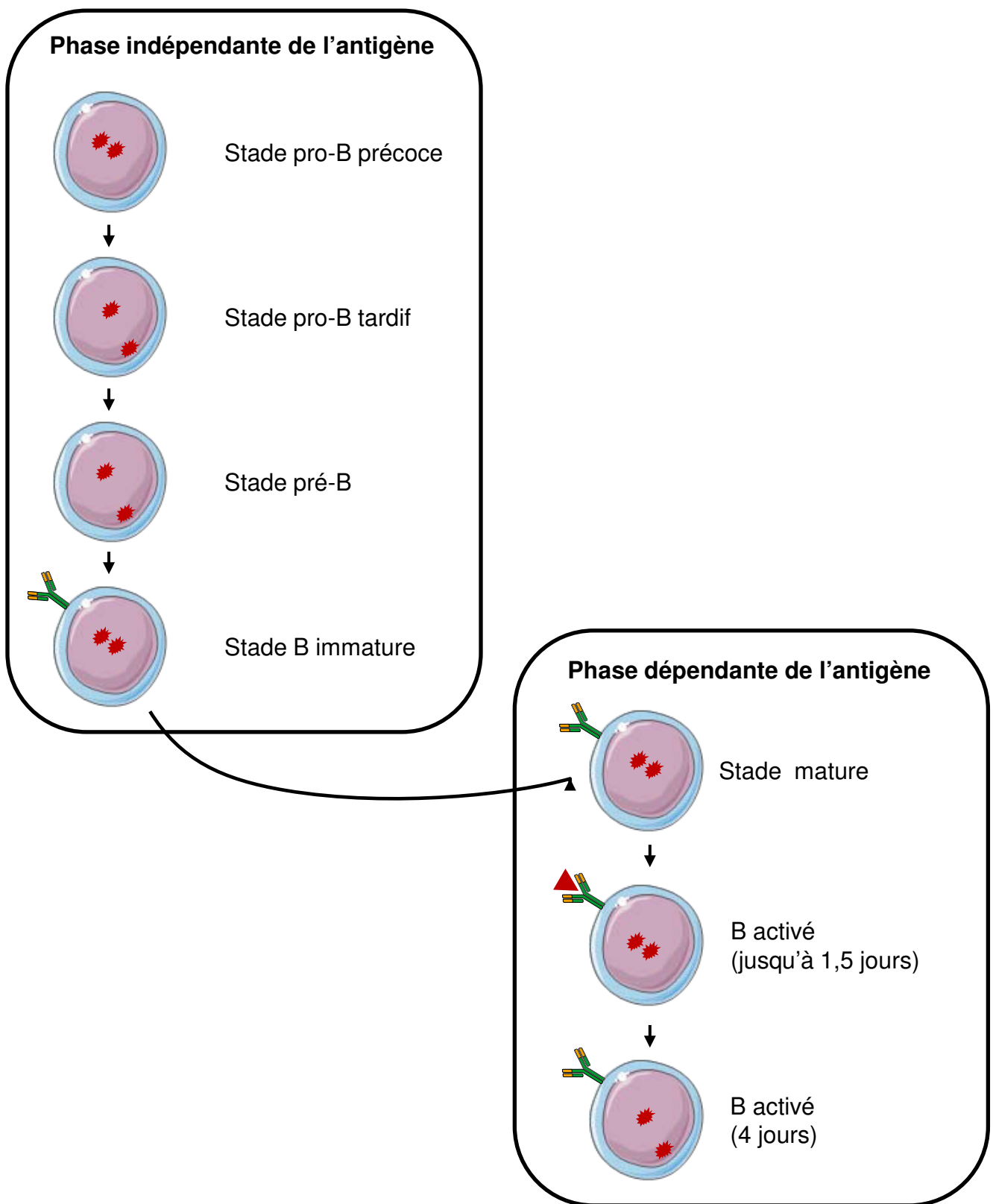


Figure 35 – Localisation nucléaire des allèles IgH au cours du développement B.

Les allèles sont représentés par des étoiles rouges. Selon le stade de développement, les allèles seront localisés au centre du noyau (euchromatine) ou en périphérie (hétérochromatine). Les allèles localisés dans l'hétérochromatine étant inaccessibles aux machineries de recombinaison, cette répartition contribue au phénomène d'exclusion allélique.

locus IgH et servirait d'isolateur transcriptionnel pour les gènes situés en aval (Birshtein, 2012).

IV) Régulation spatiale du locus IgH

Le locus IgH s'étend sur plus de 3MB et comprend de nombreux gènes et promoteurs. Le déroulement séquentiel des événements qui touchent ce locus, ainsi que les recombinaisons longues distances y ayant lieu impliquent une coordination de leur expression. Pour optimiser l'efficacité de cette régulation, le locus va modifier sa conformation spatiale tout au long du développement. On distingue deux phénomènes différents : la modification de la position du locus au sein du noyau et la formation de boucles chromatinienne rapprochant des gènes parfois distants de plusieurs kb en vue des recombinaisons.

1 La localisation du locus au cours du développement

Au sein du noyau, la chromatine n'est pas répartie de façon aléatoire mais est divisée en compartiments contenant des régions transcriptionnellement actives (ou euchromatine) ou inactives (hétérochromatine). Ainsi, le positionnement nucléaire d'un locus influe sur son expression : la localisation dans l'euchromatine, au centre du noyau, est associée à une forte transcription, tandis qu'une localisation dans l'hétérochromatine à la périphérie du noyau contribue à la répression de la transcription. Si la plupart des loci sont localisés de façon stable, certains peuvent être relocalisés de façon dynamique suite à une activation transcriptionnelle (Schneider and Grosschedl, 2007; Fedorova and Zink, 2008). Dans le cas du locus IgH, ces mécanismes sont indispensables aux réarrangements VDJ et au maintien de l'exclusion allélique (**Fig. 35**).

Au stade pro-B précoce, au moment d'initier les réarrangements D-J_H, les deux allèles vont quitter la périphérie du noyau et rejoindre un compartiment euchromatinien plus central, ce qui va permettre une activation de la transcription. A ce stade, les réarrangements auront lieu sur les deux allèles. A l'issue des réarrangements D-J_H, les allèles seront disposés de façon asymétrique : seul l'allèle subissant les réarrangements V_H-DJ_H sera localisé au centre du

noyau, tandis que le deuxième est maintenu inactif en périphérie. Cette conformation sera maintenue lors des réarrangements de chaînes légères et contribue à l'exclusion allélique (Kosak et al., 2002; Fuxa et al., 2004; Roldán et al., 2005).

A partir du stade immature, les deux allèles sont de nouveau positionnés au centre du noyau. En effet, les réarrangements secondaires qui se déroulent au stade mature ont lieu simultanément sur les deux allèles, qui doivent donc être transcrits et accessibles à AID. Ainsi, les deux allèles sont maintenus au centre du noyau au moins 1,5 jours après l'activation. En revanche, après quatre jours de stimulation seul l'allèle fonctionnel sera maintenu au centre du noyau, tandis que l'allèle réprimé sera de nouveau localisé dans l'hétérochromatine en périphérie (Skok et al., 2001).

2 La structure tridimensionnelle du locus

L'utilisation relativement homogène des différents segments V_H , pourtant répartis sur près de 2,5MB, a conduit plusieurs auteurs à rechercher une éventuelle structure 3D favorisant l'usage des segments les plus distaux. En effet, il a été démontré qu'en absence de repliement, la probabilité de recombinaison entre deux séquences diminue rapidement lorsque la distance augmente (Perlot and Alt, 2008; Lieberman-Aiden et al., 2009).

Les premières preuves de l'existence de tels repliements ont été obtenues par des expériences de FISH qui ont démontré le phénomène de contraction du locus par la formation de boucles chromatiniques (Kosak et al., 2002; Fuxa et al., 2004; Roldán et al., 2005; Jhunjhunwala et al., 2008). Ces premières observations ont ensuite été confirmées et affinées grâce au développement des techniques de 3C et 4C qui ont permis d'établir une cartographie précise des repliements (Medvedovic et al., 2013; Nicolás and Chaudhuri, 2013; Stubbington and Corcoran, 2013; Choi and Feeney, 2014).

Dans les progéniteurs lymphoïdes, le locus est sous forme « décontractée ». Lorsque les réarrangements vont être initiés, les régions qui doivent interagir entre elles vont être rapprochées au sein des mêmes boucles, tandis que les régions non concernées par ces recombinaisons sont isolées dans des boucles différentes. Ainsi, lors des réarrangements D- J_H , les segments D et J_H sont juxtaposés, tandis que les segments V_H sont maintenus à l'écart. Lors des réarrangements V_H -D J_H , le locus se contracte à nouveau, pour rapprocher les

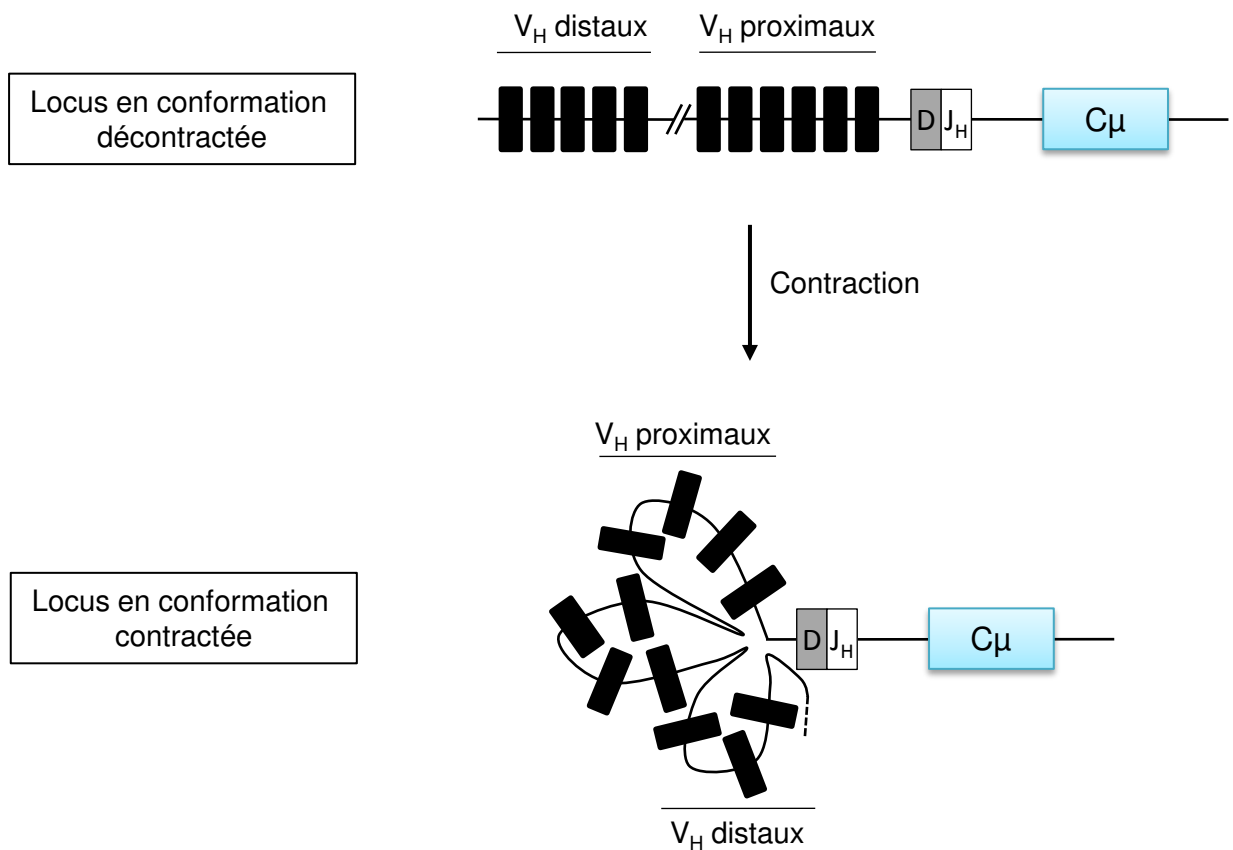


Figure 36 – Représentation schématique de la contraction du locus lors des réarrangements V_H - DJ_H .

A l'issue des réarrangements D - J_H , le locus est en conformation décontractée. La contraction du locus va alors permettre le rapprochement des segments V_H distaux et du DJ_H réarrangé en formant des boucles de chromatines, facilitant ainsi les interactions longues distances.

segments à réarranger (**Fig. 36**) (Guo et al., 2011a; Medvedovic et al., 2013). Lorsqu'un VDJ fonctionnel est assemblé, la signalisation par le pré-BCR entrainera le retour à une conformation décontractée du locus, favorisant le maintien de l'exclusion allélique (Roldán et al., 2005). Des événements similaires ont lieu lors de la CSR. En réponse à une stimulation cytokinique, des repliements vont avoir lieu et mettre en contact physique la région S α acceptrice concernée et S μ , ainsi que E μ et la 3'RR (**Fig 23**) (Wuerffel et al., 2007; Kenter et al., 2012; Feldman et al., 2015).

Ces changements de conformation sont régulés par un ensemble d'éléments qui agissent en synergie. Parmi ces éléments, on peut notamment citer CTCF, YY1 et PAX5, qui possèdent des sites de fixation disséminés tout au long du locus ainsi que les différents éléments régulateurs décrits précédemment (Gerasimova et al., 2015; Ebert et al., 2015).

3 Les lncRNA et eRNA : relation entre transcription et organisation spatiale

La localisation du locus au sein du noyau et son organisation spatiale sont donc impliquées dans la régulation de la transcription. Des études récentes ont permis de clarifier ces mécanismes. Il semblerait que la relation existe aussi dans l'autre sens : la transcription de certaines séquences participerait à la mise en place de la conformation 3D du génome. Deux types de transcrits semblent impliqués : les lncRNA (pour long non coding RNA), et les eRNA (pour enhancer RNA).

Les lncRNA sont des ARN poly-adenylés longs d'au moins 200pb qui ne codent pour aucune protéine et restent localisés dans le noyau (Hung and Chang, 2010; Yang et al., 2014). Les eRNA sont issus de la transcription de régions régulatrices. Ils sont de tailles comparables au lncRNA et sont également maintenus dans le noyau mais n'ont pas de queue poly-A et sont généralement moins stables que les lncRNA (Li et al., 2014; Kim et al., 2015). De tels transcrits ont récemment été détectés au sein de la 3'RR (Péron et al., 2012).

Ces ARN vont agir sur le locus selon deux mécanismes : d'une part ils vont permettre l'activation ou la répression de la transcription via le recrutement de facteur de transcription sur le locus, et d'autre part ils contribuent à la mise en place de sa conformation 3D en interagissant avec la cohésine ou le complexe du médiateur. Les eRNA semblent notamment impliqués dans les interactions promoteurs/enhancers, dont on connaît l'importance lors de la

CSR (Li et al., 2014; Quinodoz and Guttman, 2014). Une étude récente a permis de mettre en évidence un lncRNA localisé environ 2,6MB en aval de la 3'RR dont la délétion perturbe la CSR vers IgA dans une lignée cellulaire (Pefanis et al., 2015). Le rôle exact de ces différents transcrits dans le développement lymphocytaire B reste cependant encore à déterminer.

Les différents points évoqués au cours de ce chapitre démontrent la complexité de la régulation des événements de recombinaison qui touchent le locus IgH. Cependant, malgré ce contrôle très strict, l'induction de mutation et de DSB font de ce locus un « hotspot » de translocation, et par conséquent du lymphocyte B une source fréquente de cancer.

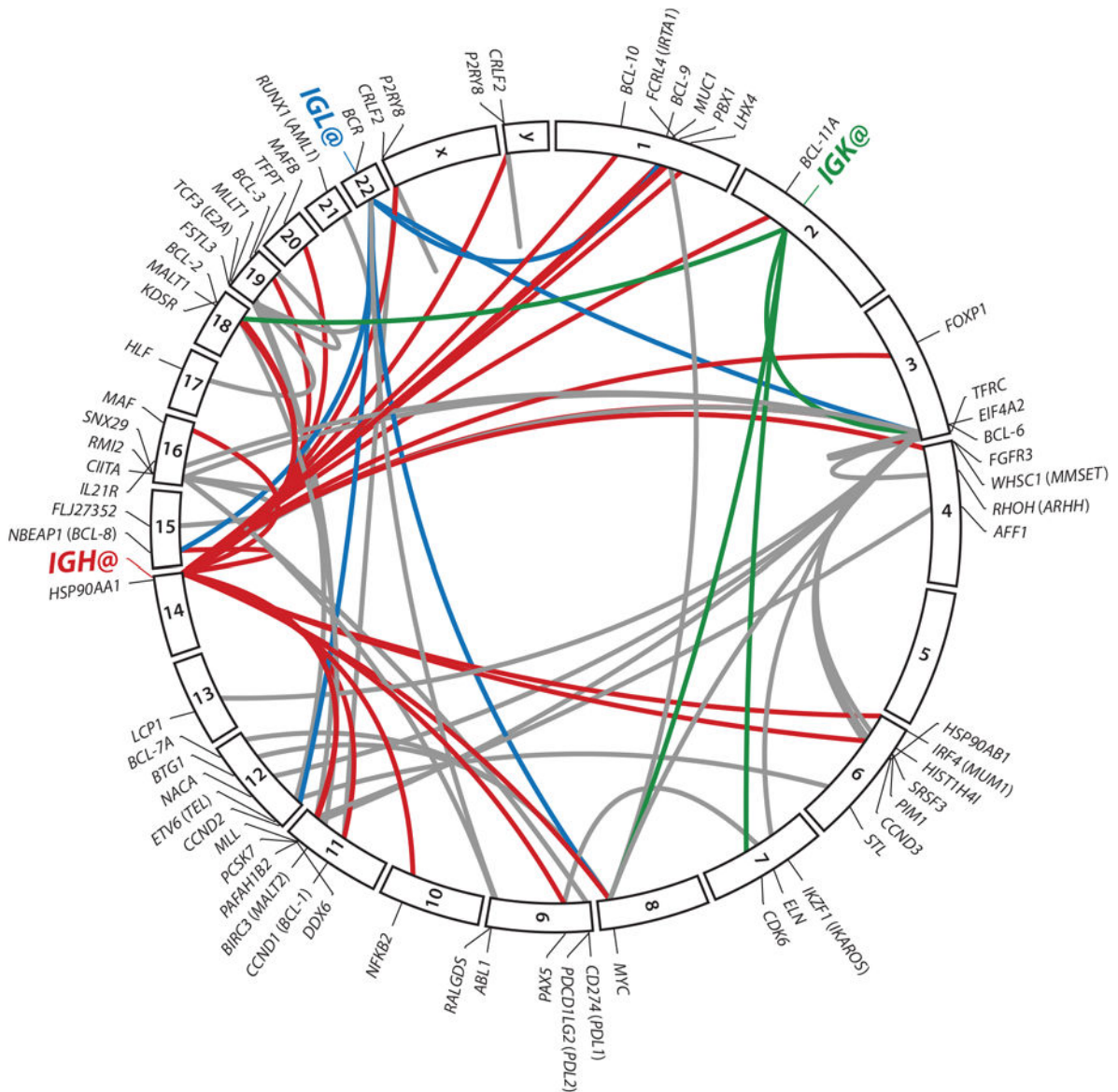


Figure 37 – Translocations récurrentes dans les lymphoproliférations B.

Le diagramme circulaire représente l'ensemble du génome humain. Les arcs relient les partenaires impliqués dans des réarrangements chromosomiques récurrents lors des pathologies malignes B. Les traits colorés indiquent les translocations concernant les gènes d'Ig. D'après Robbiani et Nussenzweig, 2014.

Chapitre 4: Introduction à la lymphomagenèse

I) L'origine des lymphoproliférations

1 Les lésions oncogéniques

Le développement et la prolifération des lymphocytes B sont des phénomènes étroitement contrôlés. Le déséquilibre de la balance entre apoptose et prolifération de ces cellules entraînera l'apparition de leucémies ou de lymphomes. Quand une cellule B subit une transformation maligne, elle conserve certains traits phénotypiques de sa cellule d'origine, permettant d'identifier le précurseur à l'origine du lymphome, et ainsi de les classer. Les lymphomes B représentent ainsi un groupe hétérogène comprenant plus de 40 sous-types, dont la majorité sont dérivés de cellules B matures (Dalla-Favera and Pasqualucci, 2015).

Pour devenir maligne, une cellule doit subir plusieurs événements oncogéniques, modifiant des fonctions en lien avec la prolifération, l'apoptose ou encore l'interaction avec l'environnement. Dans le cas des lymphomes, ces événements sont d'une part des lésions génétiques majoritairement aléatoires, et d'autre part des lésions liées aux risques induits par les recombinaisons qui ponctuent l'ontogénie B (Robbiani and Nussenzweig, 2013). Le développement des techniques de cytogénétique dans les années 1970 a permis de découvrir des translocations récurrentes dans des cellules B cancéreuses (Rowley, 1973a, 1973b). Au début des années 1980, les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis de mieux caractériser ces translocations et plusieurs équipes ont ainsi réussi à cloner le gène c-myc localisé dans le locus IgH (Crews et al., 1982; Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982; Adams et al., 1983; Cory et al., 1983; Hamlyn and Rabbitts, 1983). Depuis, de nombreuses translocations récurrentes contribuant au développement des différentes tumeurs ont été identifiées. Plus récemment l'arrivée des techniques de séquençage haut débit et de TC-seq (Translocation Capture – sequencing) a permis une étude plus exhaustive des translocations et mutations à l'origine de nombreux cancers dont les lymphomes (**Fig. 37**) (Campbell et al., 2008; Greenman et al., 2007; Wartman et al., 2011; Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Pour revue : Robbiani and Nussenzweig, 2013).

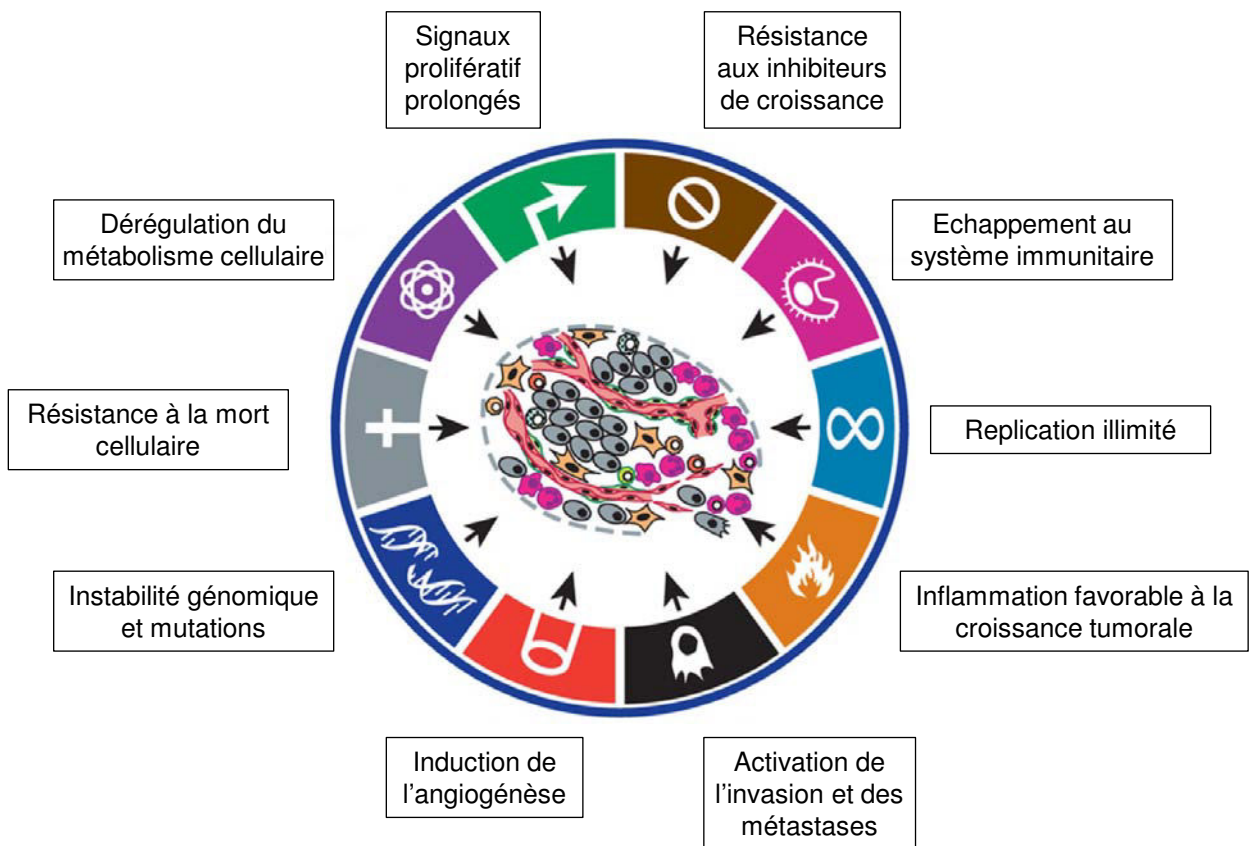


Figure 38 – Caractéristiques acquises par les cellules lors de leur cancérisation.

Pour devenir malignes, les cellules doivent accumuler plusieurs altérations géniques aboutissant à leurs dérégulations. Ces mutations peuvent affecter différents aspects de l'homéostasie cellulaire et vont conditionner l'évolution de la tumeur. Adapté d'après Hanahan et Weinberg, 2011.

Différents types de translocations sont retrouvés lors des lymphoproliférations B. Les plus fréquentes provoquent la juxtaposition d'un élément régulateur à la séquence codante intacte d'un oncogène. L'exemple le plus fréquent est la translocation du gène c-myc au sein du locus IgH, sous le contrôle transcriptionnel d'E μ et/ou de la 3'RR lors du lymphome de Burkitt. Il peut également arriver que la combinaison de deux gènes initialement localisés sur deux chromosomes différents et rapprochés par une translocation permette la synthèse d'une protéine de fusion oncogénique. C'est le cas par exemple lors de la fusion des gènes BCR et ABL1 lors de la leucémie myéloïde chronique (CML pour Chronic Myeloid Leukemia) ou la leucémie lymphocytaire aigue (B-ALL) (Küppers, 2005; Robbiani and Nussenzweig, 2013). Enfin, il arrive aussi qu'une translocation perturbe la transcription d'un miRNA, aboutissant à la dérégulation des gènes cibles de ce dernier (Calin and Croce, 2007).

Ces translocations sont généralement un des évènements les plus précoces de la transformation maligne, mais ne sont pas suffisant pour aboutir à un cancer. La cellule devra subir plusieurs évènements géniques (ou « hit ») pour aboutir à une cancérisation complète. Ces mutations vont permettre de contourner les différents « checkpoint » de la cellule, en affectant le cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose, la signalisation intracellulaire, la reconnaissance par le système immunitaire... (**Fig. 38**) (Vogelstein and Kinzler, 1993; Hanahan and Weinberg, 2011). Ces altérations génétiques ne sont pas spécifiques des lymphoproliférations, mais sont retrouvées dans de nombreux types de cancers. C'est le cas par exemple du gène TP53 qui code la protéine suppresseur de tumeur p53, et est muté dans près de la moitié des tumeurs chez l'homme. Ce facteur de transcription, parfois appelé « gardien du génome », entraîne l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à un stress (lésion de l'ADN, défaut de réplication...). Sa mutation va donc créer un environnement permissif au développement de tumeurs (Zilfou and Lowe, 2009; Goh et al., 2011).

2 Origine cellulaire des lymphomes

Les tumeurs lymphocytaires B peuvent impliquer des cellules plus ou moins matures, des cellules les plus indifférenciées lors de la B-ALL jusqu'aux cellules plasmiques entièrement différenciées dans le myélome multiple (Campos-Sanchez et al., 2011; Robbiani and Nussenzweig, 2013). La majorité des lymphomes humains semblent issus de cellules du GC ou post-GC (**Fig. 39**). Cette observation peut sembler surprenante, puisque les

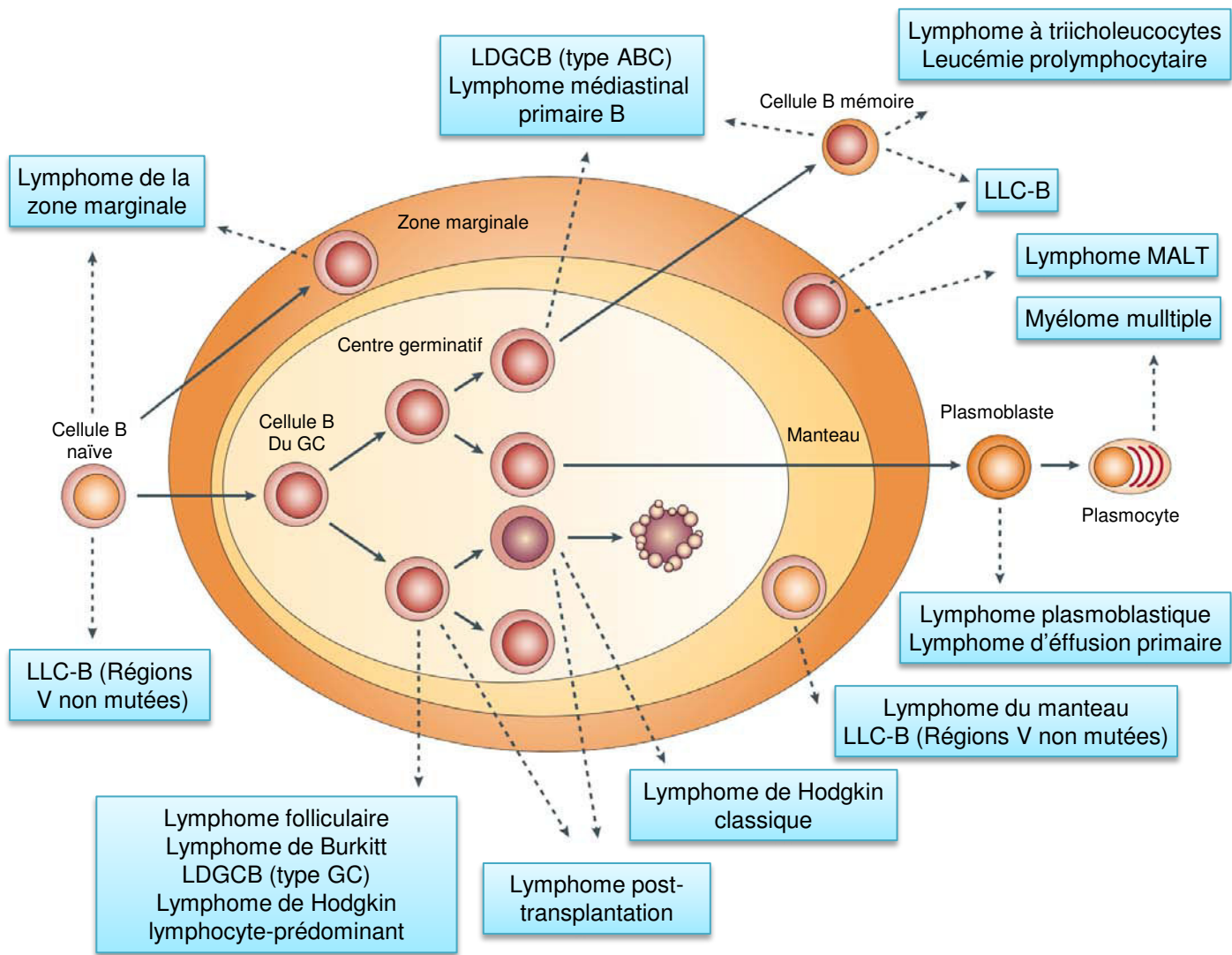


Figure 39 – L'origine cellulaire des lymphomes B.

Les lymphomes B sont désignés selon la contrepartie normale des cellules cancéreuses. La majeure partie des lymphomes provient de cellules B du centre germinatif. Les flèches continues représentent la maturation normale des cellules. Les flèches en pointillés indiquent les lymphomes issus de chaque type cellulaire. D'après Küppers, 2005

lymphocytes B ne passent que peu de temps dans le GC et que les lymphocytes B naïfs représentent plus de la moitié du pool de cellules B. Cela s'explique cependant par la prolifération intense des cellules du GC et le déroulement de la SHM et de la CSR, qui augmentent le risque de mutations oncogéniques.

La notion de cellule d'origine doit cependant être nuancée. Comme mentionnée précédemment, la cancérisation d'une cellule se fait en plusieurs étapes, pouvant se dérouler à différents stades de développement. Il est ainsi difficile de déterminer quelle étape représente réellement la cellule d'origine. Par exemple, dans les lymphomes folliculaires, le premier évènement oncogénique est fréquemment une translocation plaçant l'oncogène Bcl2 au sein du locus IgH. Cette translocation a généralement lieu lors du stade pro-B, mais n'entraînera le développement d'un lymphome que lors des stades tardifs, auxquels Bcl2 est normalement réprimé (Seifert et al., 2013). C'est pour ces raisons que le terme « contrepartie normale » d'une cellule cancéreuse est souvent préféré à « cellule d'origine ».

3 Hétérogénéité des tumeurs

Lors de leur cancérisation, les cellules vont subir des mutations qui vont modifier leur fonctionnement. Au sein de ces mutations on distingue celles dites « *drivers* », qui vont contribuer à donner un avantage sélectif à la cellule et les mutations dites « passagères » qui ont un effet neutre (Pon and Marra, 2015). Ainsi une tumeur, qu'elle soit solide ou hématologique, n'est pas composée d'un seul clone mais de plusieurs. Ces différents clones sont proches, d'origine commune, mais possède différentes mutations : on parle d'hétérogénéité intraclonale. Cette complexité des tumeurs doit être prise en compte, puisqu'elle va influencer leur évolution (**Fig. 40**) (Pour revue : Brioli et al., 2014).

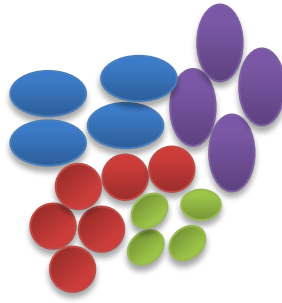
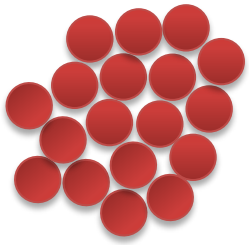
Cette hétérogénéité fait du cancer un système sujet à une évolution suivant un modèle darwinien. Cette théorie a été proposée pour la première fois en 1976 et a depuis été confirmée grâce aux techniques modernes de séquençage à haut débit (Nowell, 1976; Pepper et al., 2009; Greaves and Maley, 2012). La croissance tumorale est limitée par son environnement, par exemple par la limitation des ressources ou la réaction immunitaire. Une sélection naturelle a donc lieu au sein de la tumeur, qui favorisera l'émergence de clones porteurs de mutations leur conférant un avantage : prolifération plus rapide, résistance à

Tumeur clonale

Hétérogénéité inter-clonale

Hétérogénéité intra-clonale

A



B

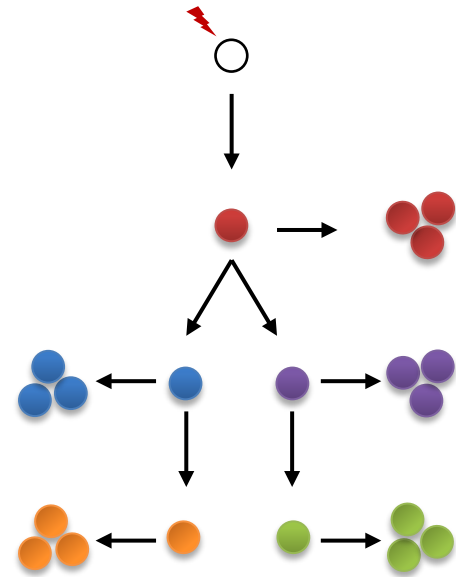
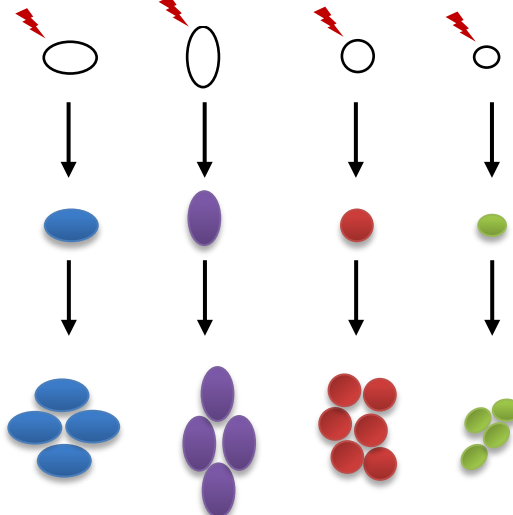
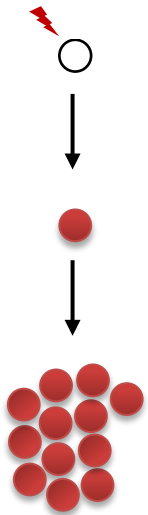


Figure 40 – Représentation graphique de la composition clonale de tumeurs.

(A) Représente le phénotype de la tumeur, (B) son arbre phylogénétique. Les cercles blancs représentent les cellules saines et les colorés les cellules tumorales.

Une tumeur peut être clonale, toutes les cellules portant les mêmes caractéristiques et mutations, ou hétérogène. On distingue l'hétérogénéité inter-clonale et intra-clonale. On parle d'inter-clonalité lorsque les clones dérivent de cellules différentes ayant acquis leurs phénotypes séparément. Dans le cas de l'intra-clonalité, les différentes cellules sont toutes issues du même clone, mais ont évolué différemment. Adapté d'après Brioli et *al.*, 2014

l'apoptose, meilleure adaptation au microenvironnement, échappement au système immunitaire... (Greaves and Maley, 2012). Cette notion de sélection naturelle est importante, puisqu'elle suggère que l'évolution d'une tumeur ne dépend pas uniquement de la cellule d'origine ni de l'altération oncogénique initiale, mais également du contexte dans lequel elle se trouve. Ainsi, l'évolution d'une tumeur et la sélection de certains clones porteurs de nouvelles mutations dépendra de son environnement : la présence de facteurs de croissance, de cytokines, les contacts avec les cellules voisines, les contraintes spatiales... Ce phénomène de sélection clonale va être amplifié par la capacité de la tumeur à modifier son microenvironnement pour le rendre favorable à son développement (Amé-Thomas and Tarte, 2014; Taylor and Gribben, 2015). De plus, certaines mutations vont faciliter l'apparition de nouvelles altérations, soit en inactivant des protéines indispensables à la stabilité du génome, ou en fragilisant certains sites du génome (Ozeri-Galai et al., 2014; Miron et al., 2015).

Ainsi l'évolution d'une tumeur dépendra de l'altération oncogénique initiale et de la cellule dans laquelle elle a eu lieu, mais sera également influencée par son microenvironnement, les altérations épigénétiques, les voies de signalisation activées, les mutations secondaires etc... Un exemple de cette complexité a été établi entre autre par plusieurs études menées par le laboratoire. La première démontre que deux mutations différentes (touchant TP53 ou CDK4) induisent toutes deux l'apparition de tumeurs similaires à des lymphomes du manteau (mantle cell lymphoma-like lymphomas) lorsqu'elles sont couplées à la translocation de c-myc sous le contrôle de la 3'RR (Rouaud et al., 2012b). Inversement, une autre étude a démontré que le fond génétique des souris influence fortement leur sensibilité au développement de tumeurs induites par la même mutation (Vincent-Fabert et al., 2009b). Enfin, l'ajout d'une mutation touchant TP53 modifie considérablement le spectre de lymphomes développés par des souris déjà porteuses d'une cassette c-myc/3'RR, confirmant l'influence des mutations secondaires sur le phénotype de la tumeur (Fiancette et al., 2011). Cette hétérogénéité influence également la réponse d'une tumeur lors d'un traitement. Ainsi, la suppression d'un clone tumoral par un traitement peut favoriser le développement d'un deuxième clone qui était jusque là maintenu quiescent par la compétition du premier (Keats et al., 2012; Brioli et al., 2014)

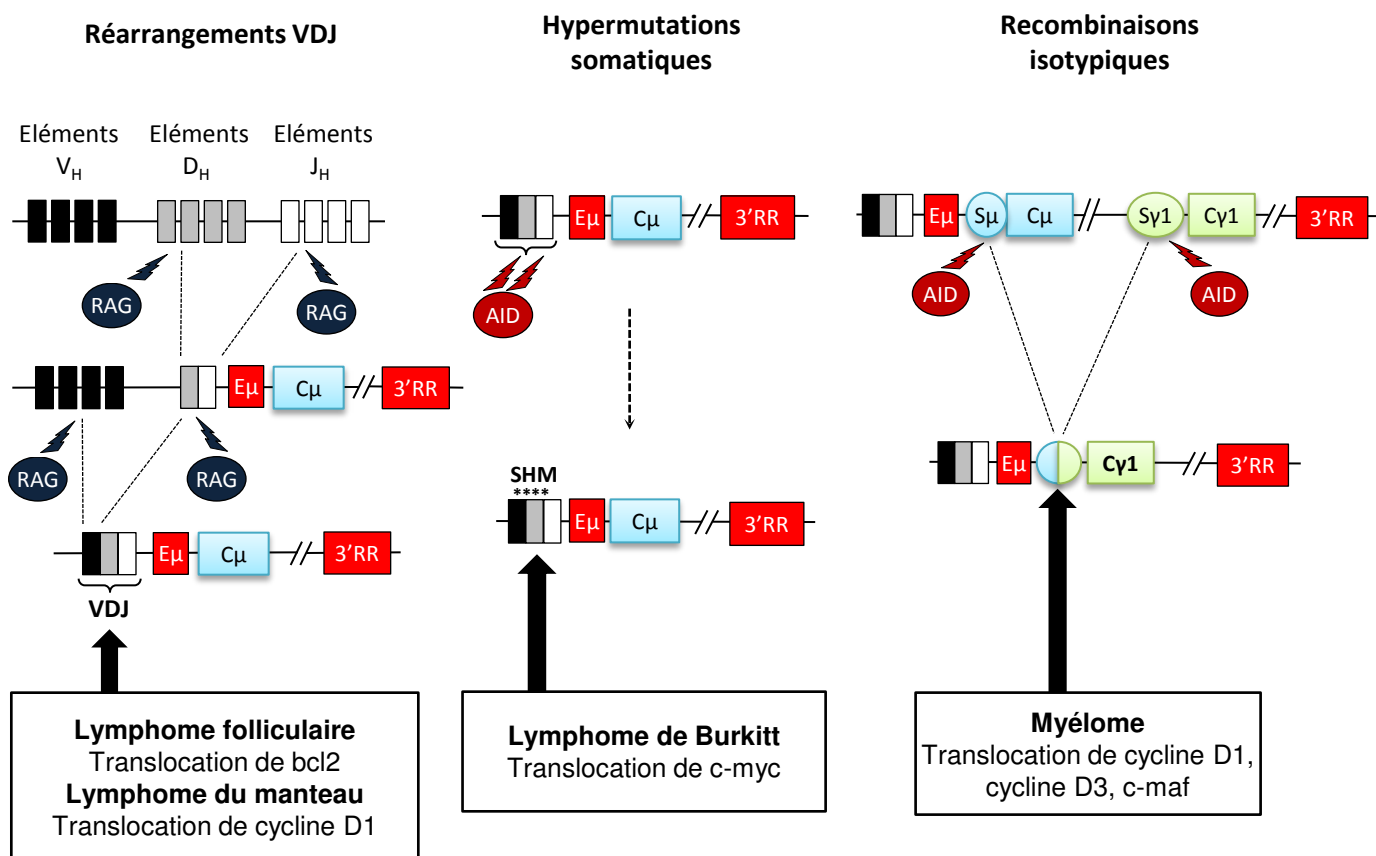


Figure 41 – Translocations récurrentes au sein du locus IgH liées aux mécanismes de diversification des Ig.

Les différents remaniements géniques qui ont lieu sur le locus IgH au cours du développement B en font un « hotspot » de translocation. Selon le mécanisme impliqué, la translocation peut avoir lieu dans les régions variables ou constantes et impliquer différents oncogènes.

II) Les altérations oncogéniques au cours de la lymphoïèse

La plupart des lymphomes B sont caractérisés par l'existence d'une translocation déplaçant un oncogène au sein des loci d'Ig, où il sera transcrit de façon constitutive sous le contrôle des éléments régulateurs de ces loci. La fréquence élevée de ces altérations géniques s'explique par l'induction de DSB au cours des réarrangements qui ponctuent la lymphopoïèse, qui font des loci d'Ig des hotspots de translocations (**Fig. 41**) (Küppers, 2005; Seifert et al., 2013).

1 Translocations lors des réarrangements VDJ : implication du complexe RAG

Lors de certaines translocations, le point de cassure au sein du locus IgH peut être adjacent aux segments D ou J, à proximité d'une RSS. La translocation résulte dans ce cas d'une erreur lors des réarrangements V(D)J. C'est le cas des translocations Bcl2-IgH ou CCND1-IgH (Cycline D1-IgH), associées respectivement au lymphome folliculaire et au lymphome du manteau (Küppers, 2005; Robbiani and Nussenzweig, 2013). Ces translocations nécessitent l'induction de deux DSB : une dans le locus d'Ig, l'autre à proximité de l'oncogène. Elles sont classées en deux catégories : celles où les deux DSB sont induites par les enzymes RAG, et celles où seule la DSB dans le locus d'Ig est dépendante de RAG, tandis que la deuxième est due à d'autres mécanismes (stress répliatif ou oxydatif, rayonnement, agent chimique...) (Mani and Chinnaiyan, 2010).

Dans le cas d'une cassure RAG dépendante, cette activité « off target » peut toucher deux types de cibles : des sites dits « cryptiques », suffisamment similaires aux sites RSS pour être ciblés par le complexe RAG ; ou des fragments d'ADN adoptant une structure « non B », capables de recruter le complexe RAG. Ce dernier cas de figure est notamment rencontré lors des translocations de Bcl2, dont une partie de la séquence, nommée Bcl2-Mbr (pour Bcl2 *major breakpoint*) est fréquemment exposée sous forme simple brin. Dans le cas où les deux cassures sont dépendantes de RAG, la translocation est due à un réarrangement VDJ illégitime, et implique la formation d'une synapse entre les deux complexes RAG. Dans le cas d'une cassure RAG indépendante, l'extrémité de l'oncogène va envahir un complexe

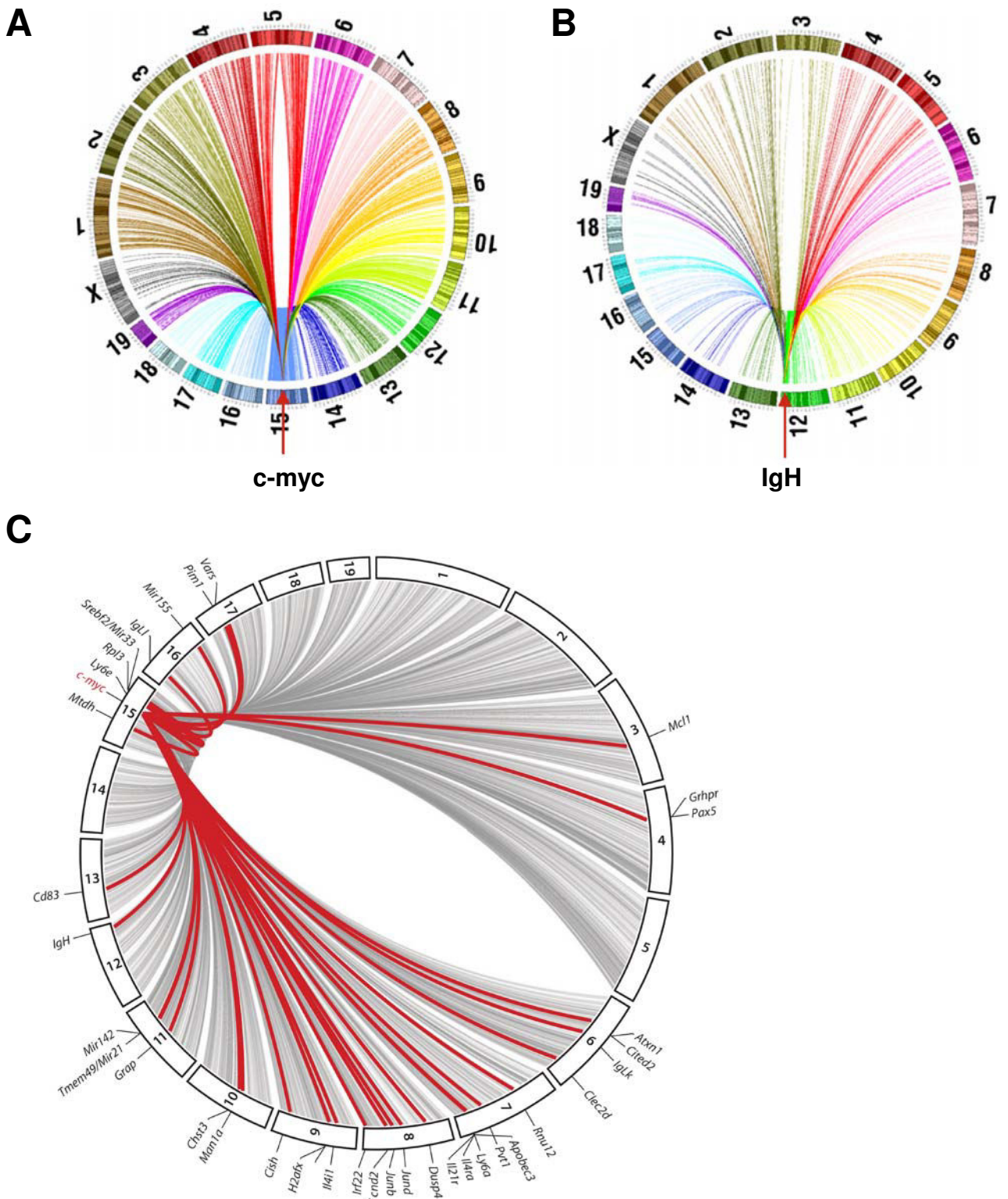


Figure 42 – Partenaires de c-myc et du locus IgH lors des translocations.

La technique de TC-seq a permis d'identifier les partenaires potentiels de c-myc (A) et du locus IgH (B) lors de translocations. Cette technique consiste à induire *via* l'endonuclease I-SceI des cassures dans une séquence déterminée (dite « cible ») et d'identifier par séquençage haut débit les gènes qui seront transloqués au niveau de cette cible. En comparant les données obtenues dans un fond déficient ou non pour AID (C), il est possible d'identifier quels sont les gènes dont la cassure permettant la translocation est dépendante d'AID (en rouge sur le schéma). D'après Chiarles et *al.*, 2011 ; Robbiani et Nussenzweig, 2014.

synaptique formé lors d'une recombinaison VDJ légitime (Lieber et al., 2006; Marculescu et al., 2006; Jankovic et al., 2007).

2 Translocation lors des réarrangements secondaires : implication de l'enzyme AID

Les points de cassures lors de certaines translocations sont situés au sein ou à proximité de l'exon VDJ réarrangé. C'est par exemple le cas de la translocation c-myc-IgH lors du lymphome de Burkitt endémique. Ce type de translocation est caractéristique d'une erreur de réparation lors de la SHM. En effet, bien qu'elles ne soient pas nécessaires, il arrive souvent que des DSB soient induites lors de ce mécanisme, facilitant l'apparition de translocations. D'autre part, certaines translocations ont lieu au sein des régions *switchs* précédant les exons constants, et sont dues à des réparations illégitimes lors de la CSR. C'est le cas par exemple des translocations c-myc-IgH ou c-maf-IgH, respectivement observées dans les lymphomes de Burkitt sporadiques ou les myélomes multiples (Robbiani and Nussenzweig, 2013; Seifert et al., 2013).

Comme décrit précédemment, une translocation requiert l'induction simultanée de deux DSB. Si les DSB au sein du locus IgH sont dues à l'action physiologique d'AID, celle à proximité de l'oncogène peuvent être due à des mécanismes non spécifiques des cellules B, ou à l'activité « *off target* » d'AID. En effet, malgré sa régulation très stricte, AID peut cibler certaines régions du génome de façon non spécifique. Des expériences de ChIP-seq ont ainsi démontré qu'AID est capable de se lier sur plusieurs centaines de sites (Yamane et al., 2011). Même s'il a été établi que la fixation d'AID n'était pas toujours représentative d'une activité mutagénique, son implication dans la lymphomagenèse et dans l'induction de DSB autour d'oncogènes a été largement démontrée, notamment grâce à l'utilisation de modèles murins (Ramiro et al., 2004; Jankovic et al., 2010; Matthews et al., 2014b).

Deux études récentes ont permis d'identifier les principales cibles *off target* d'AID. En utilisant comme cibles des cassures induites par I-SceI dans c-myc ou au sein du locus IgH, les auteurs ont identifiés les partenaires impliqués dans des translocations par TC-seq. La comparaison des résultats en présence ou en absence d'AID a permis de recenser les *hotspots* de mutations AID-dépendantes (**Fig. 42**). La détection de nombreuses mutations somatiques

dans les gènes ainsi identifiés a confirmé leur ciblage par AID (Chiarle et al., 2011; Klein et al., 2011; Pour revue : Robbiani and Nussenzweig, 2013). AID est fortement exprimée dans plusieurs lymphomes B humains, notamment ceux issus de cellules du GC. Cette présence d'AID n'est pas toujours liée au déroulement de la SHM, mais est dans certains cas associée à un plus mauvais pronostic (Okazaki et al., 2007).

De nombreuses équipes travaillent actuellement à déterminer les facteurs expliquant l'implication préférentielle de ces gènes dans les translocations AID-dépendantes. Les connaissances actuelles suggèrent que le ciblage par AID est du à la présence de certains facteurs sur ces gènes : machinerie de transcription, marques épigénétiques, R-loops... (Duke et al., 2013; Wang et al., 2014a). D'autre part, l'organisation spatiale nucléaire semble jouer un rôle important, les translocations étant plus fréquentes entre gènes localisés en *cis* ou à proximité au sein du noyau (Klein et al., 2011; Zhang et al., 2012). Il a également été suggéré que la localisation d'un gène à proximité du locus IgH favorise son ciblage par AID, mais ces résultats sont encore sujets à controverse (Hakim et al., 2012; Gramlich et al., 2012; Rocha et al., 2012; Casellas et al., 2013; Rocha et al., 2013)

3 La 3'RR lors de la lymphomagenèse

La translocation d'un oncogène au sein du locus IgH entraîne sa surexpression, ce qui suggère qu'il passe sous le contrôle transcriptionnel des éléments régulateurs de ce locus (Pour revue : Vincent-Fabert et al., 2010b; Pinaud et al., 2011). L'enhancer intronique E μ a été initialement suggéré comme étant l'acteur critique de cette dérégulation. Cependant, les souris transgéniques contenant une cassette E μ -c-myc ne développent que des tumeurs de phénotypes immatures, différentes des lymphomes de Burkitt matures retrouvés chez l'homme suite à une translocation c-myc-IgH (Schmidt et al., 1988; Janz, 2006). De même, la transfection d'une cassette E μ -CCND1 n'entraîne l'apparition d'aucune tumeur lymphoïde (Lovec et al., 1994). Ces résultats, et le fait qu'E μ puisse être délété lors des translocations c-myc-IgH ont conduit les auteurs à suggérer que la 3'RR soit responsable de la dérégulation de l'oncogène transloqué (Gostissa et al., 2009).

L'implication de la 3'RR a été confirmée par de nouveaux modèles murins : la transfection de cassette c-myc-3'RR ou le knock-in d'une cassette 3'RR en 5' du c-myc

endogène induit l'apparition de lymphomes B similaires au lymphome de Burkitt humains (Wang and Boxer, 2005; Truffinet et al., 2007). La confirmation définitive du rôle de la 3'RR a été apportée par la délétion des enhancers hs3b et hs4 dans des modèles de souris favorisant le développement de lymphomes. Les auteurs ont démontré que la 3'RR est indispensable au développement de lymphomes matures mais pas de lymphomes pro-B (Gostissa et al., 2009). Des études *in vitro* ont également prouvé que la 3'RR est responsable de la dérégulation de Bcl-2 lors des lymphomes impliquant une translocation Bcl-2-IgH (Duan et al., 2007).

L'ensemble de ces études a confirmé l'importance de la 3'RR lors de la lymphomagenèse, et la pertinence des modèles murins comme outils d'étude du développement de ces pathologies. Ce rôle de la 3'RR dans la dérégulation oncogénique suggère que son inhibition ciblée pourrait se révéler une stratégie thérapeutique prometteuse dans le cas des lymphomes matures. Notamment, les inhibiteurs d'histone déacétylase semblent une piste intéressante. Certaines de ces molécules, capables de réprimer l'expression du locus IgH via la 3'RR, sont actuellement en phase d'essai clinique pour le traitement de différents types de tumeurs et montrent une cytotoxicité importante pour les cellules cancéreuses (Lu et al., 2005; Bose et al., 2014; Slingerland et al., 2014; Waibel et al., 2015).

Problématiques et objectifs

Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse a été d'étudier plus en détail le rôle de la 3'RR lors du développement B normal. J'ai également contribué à certains projets visant à mieux comprendre son implication lors de la lymphomogenèse. Mon travail sur le rôle physiologique de la 3'RR a tout d'abord concerné l'analyse du modèle de délétion complète de cette région, préalablement créé au laboratoire. Il avait déjà permis de mettre en évidence que la 3'RR intervient lors de la CSR, mais pas lors des réarrangements VDJ (Vincent-Fabert et al., 2010a; Rouaud et al., 2012a).

J'ai tout d'abord contribué à l'achèvement d'une étude qui a permis de mettre en évidence le rôle capital de la 3'RR lors de la SHM (article 1). Puis nous nous sommes intéressés à son rôle précis lors de la CSR. Ces études ont tout d'abord permis de démasquer et d'étudier un phénomène rare : la CSR vers IgD (article 2). Puis nous avons analysé en détail la mécanistique de la 3'RR lors de la CSR, expliquant ainsi sa quasi disparition dans les souris déficientes pour la 3'RR (article 3). Enfin, nous avons étudié l'impact de la délétion de la 3'RR sur le développement et la répartition des sous populations lymphocytaires B matures (article 4).

J'ai également pu travailler sur deux nouveaux modèles murins dont la création avait été initiée avant mon arrivée au laboratoire. Ils visent à élucider le rôle de l'architecture palindromique caractéristique de la 3'RR, en comparant l'effet de la délétion des deux premiers *enhancers* à celui de la simple suppression de la structure palindromique (article 5).

Parallèlement à ces travaux, j'ai contribué à différents projets visant notamment à détailler le rôle de la 3'RR lors de l'inflammation ou lors du développement de tumeurs dans un modèle mimant la translocation de c-myc au sein du locus $Ig\lambda$. Enfin, j'ai également participé à l'analyse d'un modèle de souris déficient pour l'intégralité du palindrome de la 3'RR. Les articles issus de ces travaux seront présentés en annexe.

Resultats

Article 1

The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, **Alexis Saintamand**, Rémi Fiancette, Marie Marquet, Isabelle Robert, Bernardo Reina-San-Martin, Eric Pinaud, Michel Cogné & Yves Denizot

The Journal of Experimental Medicine, 2013, volume 210, numéro 8, pages 1501-1507.

Cet article est l'aboutissement d'une étude visant à déterminer l'importance de la 3'RR lors de la SHM dans les cellules B du GC *in vivo*. Même si je n'ai que modestement participé à l'achèvement de ce projet, il m'a semblé pertinent de faire paraître cet article dans ce manuscrit, puisqu'il fait partie d'une série de publications utilisant le modèle murin de délétion totale de la 3'RR pour étudier son rôle dans les différents aspects de l'ontogénie B.

Ces souris avaient déjà permis de démontrer que la délétion de la 3'RR altérait la CSR et la sécrétion d'Ig pour tous les isotypes mais ne perturbait pas les réarrangements VDJ (Vincent-Fabert et al., 2010a; Rouaud et al., 2012a). Le rôle de la 3'RR lors de la SHM restait encore à élucider. La délétion des deux derniers *enhancers* (hs3b et hs4) dans un modèle murin ne diminuait pas la SHM. Cependant d'autres éléments plaidaient en faveur d'un rôle de la 3'RR lors de ce mécanisme. Des expériences de transgénèses avaient en effet montré qu'hs3b et hs4 permettaient d'induire la SHM dans des séquences transcrites, tandis que l'utilisation de BAC, délétés ou non pour la 3'RR, avait permis de montrer l'importance de cette dernière pour l'hypermutation d'un VDJ pré-réarrangé (Terauchi et al., 2001; Dunnick et al., 2009). Son rôle dans la SHM du locus IgH endogène *in vivo* n'avait cependant jamais été démontré.

Nous avons triés des lymphocytes B activés du GC obtenus à partir de plaque de Peyers de souris après 15 jours de stimulation *in vivo*. Nous avons ensuite séquencé un fragment intronique d'environ 500pb localisé juste en aval du segment J_H4. L'analyse des séquences a montré une baisse de 90% du nombre de séquences mutées, et une diminution de 98% de la fréquence de mutation dans les souris déficientes pour la 3'RR. L'analyse de la fréquence de mutation dans S_μ, qui est également ciblé par la SHM, montre une baisse

similaire. En contrôle, ni la fréquence de SHM dans le locus Ig κ , ni le niveau d'expression d'AID ne sont affectés.

Ces résultats suggéraient que la baisse était due à une altération du locus IgH plutôt qu'à un défaut d'activation des lymphocytes B. La transcription étant un pré-requis indispensable à la CSR, nous l'avons mesurée au locus IgH et Ig κ . Nous avons observé une baisse de 50% de la transcription au locus IgH dans les souris 3'RR KO, tandis qu'elle restait inchangée au locus Ig κ . Cette baisse de la transcription pourrait expliquer la diminution de la SHM, mais cela impliquerait que la fréquence de mutation n'est pas corrélée de façon linéaire au taux de transcription.

Ces résultats nous ont poussés à mesurer le recrutement d'AID sur les régions cibles de la SHM par des expériences de ChIP. Seul un bruit de fond (similaire à celui observé dans les souris AID^{-/-}) a pu être mesuré dans les souris mutantes. Ces résultats montrent donc que la baisse de la SHM induite par la délétion de la 3'RR est due à un défaut de recrutement d'AID.

En résumé, notre étude a démontré que :

- La 3'RR est nécessaire à la SHM dans les B du GC.
- La fréquence de mutation n'est pas corrélée de façon linéaire à la transcription.
- La 3'RR intervient (de façon directe ou non) lors du recrutement d'AID sur les cibles de la SHM.

The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells

Pauline Rouaud,¹ Christelle Vincent-Fabert,¹ Alexis Saintamand,¹ Rémi Fiancette,¹ Marie Marquet,¹ Isabelle Robert,² Bernardo Reina-San-Martin,² Eric Pinaud,¹ Michel Cogné,¹ and Yves Denizot¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7276, Université de Limoges, 87025 Limoges, France

²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

Interactions with cognate antigens recruit activated B cells into germinal centers where they undergo somatic hypermutation (SHM) in V(D)J exons for the generation of high-affinity antibodies. The contribution of IgH transcriptional enhancers in SHM is unclear. The E_μ enhancer upstream of C_μ has a marginal role, whereas the influence of the IgH 3' regulatory region (3'RR) enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) is controversial. To clarify the latter issue, we analyzed mice lacking the whole 30-kb extent of the IgH 3'RR. We show that SHM in V_H rearranged regions is almost totally abrogated in 3'RR-deficient mice, whereas the simultaneous Ig heavy chain transcription rate is only partially reduced. In contrast, SHM in κ light chain genes remains unaltered, acquitting for any global SHM defect in our model. Beyond class switch recombination, the IgH 3'RR is a central element that controls heavy chain accessibility to activation-induced deaminase modifications including SHM.

CORRESPONDENCE

Yves Denizot:
yves.denizot@unilim.fr
OR
Michel Cogné:
cogne@unilim.fr

Abbreviations used: 3'RR, 3' regulatory region; AID, activation-induced deaminase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CSR, class switch recombination; SHM, somatic hypermutation.

During B cell ontogeny and maturation, the IgH locus undergoes successive transcription-coupled remodeling events, including V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM), and Ig class switch recombination (CSR; Henderson and Calame, 1998). RAG-mediated V(D)J recombination occurs during the antigen-independent step of B cell development. Interactions with cognate antigens later recruit activated B cells into germinal centers and can induce various activation-induced deaminase (AID)-mediated modifications. These include SHM in V(D)J exons for the generation of high-affinity antibodies and CSR for the synthesis of non-IgM Ig with diversified effector functions. Because all Ig gene remodeling events require transcription, IgH cis-regulatory regions and especially transcriptional enhancers

are major locus regulators. Mouse models carrying targeted genomic deletions highlighted distinct roles for such regions. Deletion of regulatory elements located upstream of Ig constant gene (IgC) clusters affects mostly V(D)J recombination: the intergenic region which lies between the V_H and D clusters (IGCR1) regulates ordered and tissue-specific V_H to D_H-J_H rearrangements (Featherstone et al., 2010; Giallourakis et al., 2010; Guo et al., 2011), the 5' DQ52 enhancer element influences D gene usage (Nitschke et al., 2001; Afshar et al., 2006), and the core E_μ element allows efficient D_H to J_H recombination (Sakai et al., 1999; Perlot et al., 2005). The IgH 3' regulatory region (3'RR; encompassing the four transcriptional enhancers hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) located downstream of the IgC cluster is the master element controlling CSR (Vincent-Fabert et al., 2010; Pinaud et al., 2011). None of the

C. Vincent-Fabert's present address is Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix-Marseille University, INSERM UMR1068, CNRS UMR 7258, 13273 Marseille, France.

R. Fiancette's present address is Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge Biomedical Campus, CB2 0QH Cambridge, England, UK.

© 2013 Rouaud et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jem.rupress.org/content/suppl/2013/06/30/jem.20130072.DC1.html>

previously studied targeted alterations of the endogenous IgH locus has affected SHM. So far the deletion of both IgH 3' hs3b and hs4 enhancers only resulted in altered CSR (Pinaud et al., 2001; Morvan et al., 2003). Although CSR and SHM both require transcription and AID-mediated DNA lesions (Hackney et al., 2009), a role of the 3'RR on SHM only appeared in transgenes but not in the partial disruptions on the endogenous 3'RR, contrasting with their constant CSR defect; knockout mice lacking the 3'RR hs3b/hs4 elements thus robustly underwent V_H gene SHM (Morvan et al., 2003). On the contrary in transgenic experiments, hs3b and hs4 (but not hs1,2) proved able to target SHM onto associated transcribed sequences (Tumas-Brundage et al., 1997; Terauchi et al., 2001; Laurencikienė et al., 2007). A study of large BAC transgenes either lacking or including the whole 3'RR found this region mandatory for V(D)J transcription and for the recruitment of SHM to the transcribed V(D)J segment (Dunnick et al., 2009). Finally, the IgH 3'RR is itself targeted by AID and undergoes SHM in activated B cells (Péron et al., 2012). To clarify the long-range role of the 3'RR on SHM in the context of the endogenous locus, we analyzed IgH 3'RR-deficient mice lacking the 30-kb extent of the 3'RR, a deletion which we previously characterized as inducing a severe CSR defect (Vincent-Fabert et al., 2010), but with normal V(D)J recombination (Rouaud et al., 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

SHM at the variable region of the IgH locus is abrogated in IgH 3'RR-deficient mice

3'RR-deficient mice display normal size B cell compartments but a globally decreased Ig secretion, including a partial IgM defect and culminating in a complete blockade of class-switched isotypes, a phenotype involving both decreased Ig secretion in plasma cells and decreased CSR frequency (Vincent-Fabert et al., 2010). Because CSR and SHM are well-known temporally and spatially associated processes, both involving AID-initiated DNA lesions (Neuberger and Rada, 2007; Schatz and Ji, 2011), we explored 3'RR-deficient mice for potential SHM defects. Mice were immunized orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 µg LPS for 3 d. Oral immunization with sheep red blood cells together with 3-d intraperitoneal injection of LPS corresponds to the immunization protocol that we found the most efficient to regularly obtain in vivo activated B cells in both spleen and Peyer's patches, with high levels of somatic mutation. We are thus now routinely using this protocol as a standard for in vivo B cell stimulations. Similar occurrence ($P > 0.5$) of germinal center B cells (B220⁺PNA^{high}Fas⁺) were found in Peyer's patches of 3'RR-deficient and WT mice: $17.6 \pm 3.5\%$ vs. $18.6 \pm 1.8\%$ of PNA^{high}Fas⁺ cells among B220⁺ cells; means obtained from groups of five mice. Numbers of Peyer's patches were similar in 3'RR-deficient (mean of 7, range 5–10, $n = 8$) and WT mice (mean of 6, range 4–8, $n = 8$). The total number of cells in Peyer's patches was slightly higher in 3'RR-deficient (mean of 22×10^6 cells/mouse,

range 13–31, $n = 8$) than in WT mice (mean of 8×10^6 cells/mouse, range 5–10, $n = 8$). Rearranged IgH V(D)J regions from B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells (10 3'RR-deficient and 8 WT mice) were cloned and sequenced to evaluate the role of the 3'RR in SHM. Ensuring that the reference SHM level in B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells pooled from the eight WT mice was not biased by any "jackpot" high SHM in a few mice, four individually evaluated animals under this immunization protocol consistently and homogeneously showed the high SHM rate expected in WT mice (Fig. 1 B, right). A dramatic decrease ($P < 0.0001$, Mann–Whitney *U* test) in the relative number of mutated sequences was found in 3'RR-deficient mice (5%, 6/119) as compared with WT (94%, 121/129; Fig. 1 A). The mutation frequency in 3'RR-deficient mice (14 mutations among 64,044 bp analyzed, 0.022%) was compared with WT (902 mutations among 68,841 bp analyzed, 1.3%) and showed a >98% reduction ($P < 0.0001$, Mann–Whitney *U* test). When comparing the frequency of mutations per sequence, we found in 3'RR-deficient mice a lower frequency (1% compared with 57% in WT, $P < 0.0001$) of clones carrying multiple mutations (over five mutations in the analyzed region; Fig. 1 B, left). Although the number of mutations in 3'RR sequences is small, we found that the proportion of mutations at C/G did not significantly differ between WT (43.3%) and 3'RR-deficient mice (35.7%) and that A↔G transitions represented 50.8% and 41.0% for WT and 3'RR-deficient mice, respectively (not depicted). Thus, deletion of the IgH 3'RR nearly abrogates the SHM process in V_H regions.

Expression of AID and SHM-related cofactors are unaffected in 3'RR-deficient mice

We investigated the transcripts encoding several proteins involved in SHM (Neuberger and Rada, 2007). Transcripts for AID, POL η , REV1, UNG, MSH2, and MSH6 were detected in similar amounts ($P > 0.1$) in Peyer's patch B cells from 3'RR-deficient and WT mice, showing that at the RNA level, 3'RR-deficient B cells normally express the SHM trans-acting machinery (not depicted). Thus, lack of SHM in IgH V(D)J segments in 3'RR-deficient mice is not related to a deficiency of AID and related cofactor expression.

SHM at the variable region of the Ig κ locus is normal in 3'RR-deficient mice

To further check that the lack of SHM at the heavy chain locus is not related to a global decrease of SHM in 3'RR-deficient mouse B cells, we investigated SHM in the Ig κ locus. A similar number of mutated sequences was found in 3'RR-deficient (87%, 33/38) and WT mouse B cells (91%, 44/48; Fig. 1 A). The mutation frequency in 3'RR-deficient mice (255 mutations among 18,282 bp analyzed, 1.39%) was similar to WT (296 mutations among 24,376 bp analyzed, 1.21%). When comparing the number of mutations per sequence, we found a similar number of clones from 3'RR-deficient cells that carried multiple mutations (i.e., with over

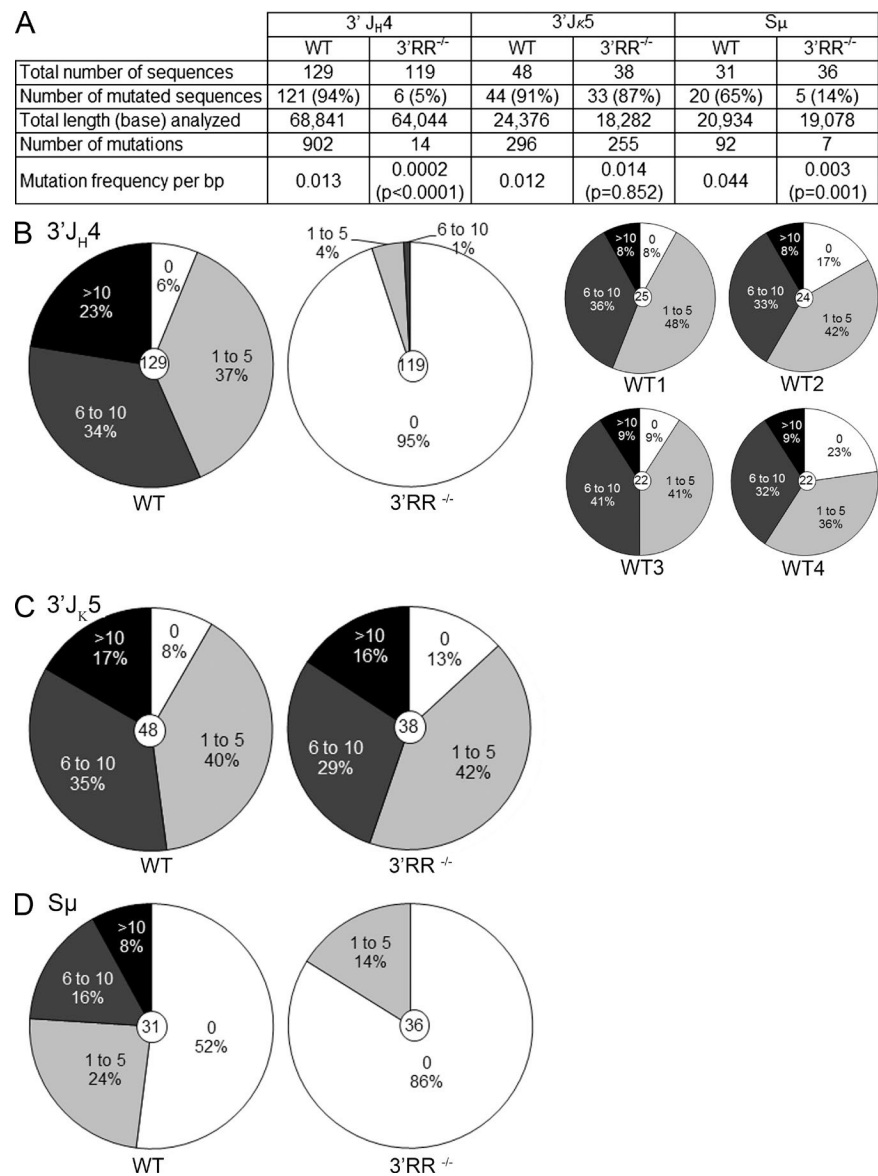


Figure 1. V(D)J, Ig κ , and E μ SHM in 3'RR-deficient and WT mice. (A) Expressed IgH V(D)J regions and C κ regions from B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells were cloned and sequenced. Number of mutated sequences, number of mutations, and mutation frequency are reported. Clonally related sequences were excluded. Statistical differences were investigated with the Mann–Whitney *U* test. Peyer's patches from 10 3'RR-deficient and 12 WT mice were used for B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cell purification. Mice were 8 wk old, and immunizations were performed orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 d. (B) Mutation analysis in expressed IgH V(D)J regions of 3'RR-deficient mice and WT mice. (left) Expressed IgH V(D)J region B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells were cloned and sequenced (12 WT and 10 3'RR-deficient mice). (right) Mutations found in four separated WT mice. (C) Mutation analysis in expressed C κ regions of 10 3'RR-deficient and 12 WT mice. (D) Mutation analysis in the 5' end of S μ . B splenocytes from five 3'RR-deficient and five WT mice were used for B220⁺PNA^{high} cell purification. Mice were 8 wk old, and immunizations were performed orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 d.

five mutations in the analyzed region: 45% for 3'RR-deficient mice compared with 52% in WT; Fig. 1 C). The proportion of transitions did not differ between WT (52.4%) and 3'RR-deficient mice (51.8%), and A \leftrightarrow G transitions represented 43.8% and 34.0% for WT and 3'RR-deficient mice, respectively (not depicted). Thus, deletion of the 3'RR specifically abrogates the SHM process in the heavy chain locus without significantly affecting the κ light chain locus.

IgH transcription is reduced but not abrogated in 3'RR-deficient mice

SHM correlates with transcription (Fukita et al., 1998). Alterations of the SHM rate have been reported using BAC transgenes with large deletion of the 3'RR, although transcription of these transgenes was variably affected by the deletion (Dunnick et al., 2009). In contrast, the partial IgH transcription defect observed in hs3b/4-deficient mouse resting B cells did

not lead to any significant SHM decrease in germinal center B cells (Morvan et al., 2003). The situation is quite different in 3'RR-deficient mice, which showed a nearly complete V(D)J SHM blockade (98% of reduction) along with only a partial decrease (40%) of IgH primary transcripts in B220⁺ PNA^{high}Fas⁺ Peyer's patch B cells (Fig. 2 A). In contrast, deletion

of the 3'RR did not affect SHM (Fig. 1 C) and transcription at the κ light chain locus (Fig. 2 B). Our model indicates that Ig heavy chain primary transcription is maintained at a fairly high level in germinal center B cells devoid of 3'RR, although SHM is almost completely abrogated. This suggests that such a strong SHM defect cannot solely result from

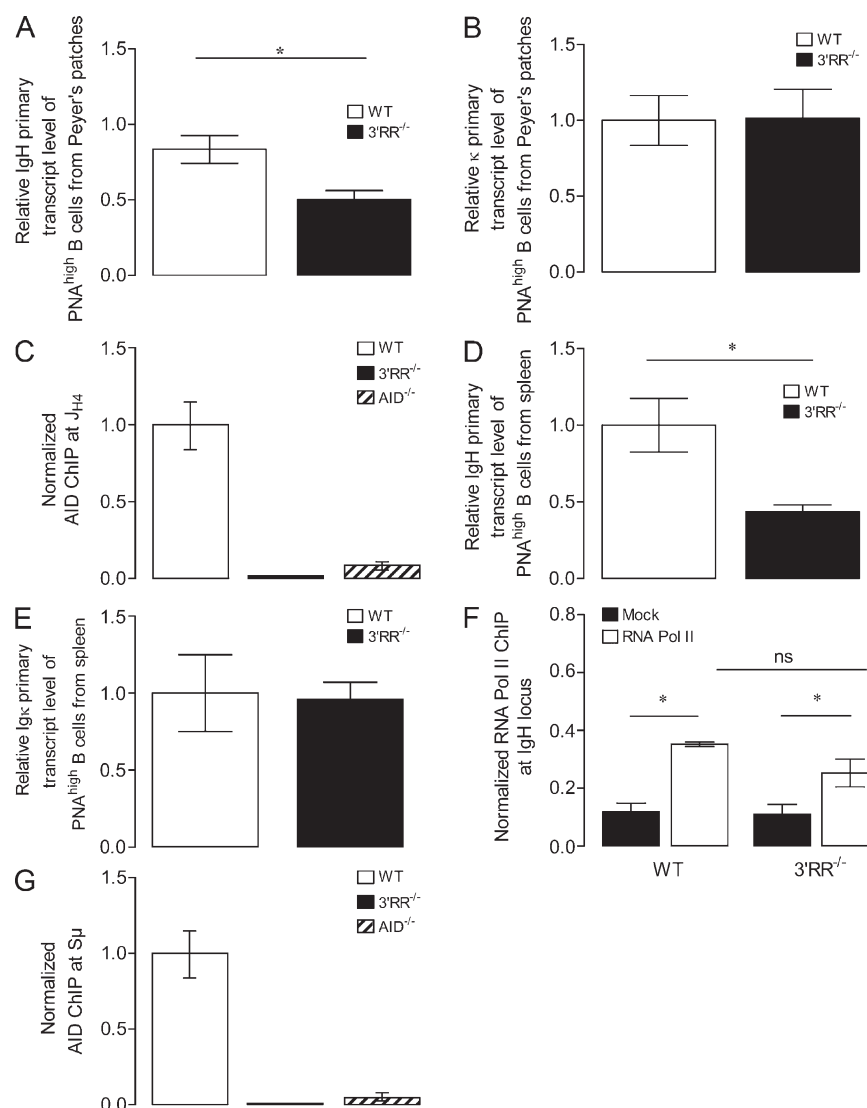


Figure 2. IgH transcription and AID-ChIP in 3'RR-deficient and WT mice. (A and B) Analysis by real-time PCR of IgH (A) and κ (B) primary transcripts in B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells from Peyer's patches of immunized 3'RR-deficient and WT mice. Transcript levels were normalized to GAPDH transcripts. Results are the mean \pm SEM of six WT and six 3'RR-deficient mice. (C) Accessibility of IgH locus downstream of J_{H4} to AID. ChIP assays were performed with splenic B cells isolated from immunized AID-deficient, 3'RR-deficient, and WT mice. For each sample, AID-ChIP values were normalized to the input control, and AID-ChIP signal in WT B cells was assigned an arbitrary value of 1. Data presented are from one primer pair and error bars corresponding to technical replicates. One representative experiment out of two is shown. (D and E) Analysis by real-time PCR of IgH (D) and κ (E) primary transcripts in B220⁺PNA^{high} splenic B cells of immunized 3'RR-deficient and WT mice. Results are the mean \pm SEM of four WT and five 3'RR-deficient mice. (F) Accessibility of IgH locus to RNA polymerase II (Pol II). ChIP assays were performed with 3-d LPS-stimulated splenic B cells isolated from 3'RR-deficient and WT mice. The relative enrichments (percent input) were analyzed by real-time PCR (same primers as for analysis of IgH primary transcripts) and compared with those of negative controls obtained without antibody (mock). Results are the mean \pm SEM of three 3'RR-deficient and three WT mice. ns, not significant. (G) ChIP analysis for AID occupancy at the S_μ region in B splenocytes of immunized WT, 3'RR-deficient, and AID-deficient mice. For each sample, AID-ChIP values (mean \pm SD) were normalized to the input control, and AID-ChIP signal in WT B cells was assigned an arbitrary value of 1. Data represent results obtained using two different primer pairs (error bars are indicative of the variation between the two PCRs). One representative experiment out of two is shown. *, $P < 0.05$; Mann-Whitney U test.

decreased transcription. Rather, our data suggest that the 3'RR could be directly essential for the recruitment of AID onto the IgH locus, a hypothesis which fits well with recent results showing that the IgH 3'RR is itself an AID target (Péron et al., 2012). To determine whether AID recruitment to the J_{H4} region is dependent on the 3'RR, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis using an anti-AID antibody on chromatin prepared from B splenocytes of WT, 3'RR-deficient, and AID-deficient mice (immunized orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 µg LPS for 3 d). We found that AID occupancy at the J_{H4} region was dramatically reduced in 3'RR-deficient mice as compared with WT (Fig. 2 C). Only background levels of immunoprecipitation were found both for 3'RR-deficient and AID-deficient mice, leading to the conclusion that AID enrichment to the IgH J_{H4} region is drastically impaired in 3'RR-deficient mice. Confirming results obtained with Peyer's patches, deletion of the 3'RR lead only to a partial decrease (50%) of IgH primary transcripts in B220⁺PNA^{high} splenic B cells (Fig. 2 D) without significant effect on κ primary transcripts (Fig. 2 E). The significant binding of RNA polymerase II on the IgH allele of 3'RR-deficient mice (after 3-d LPS stimulation of splenic B cells in vitro) confirms that transcription is maintained (Fig. 2 F). This work provides the first conclusive evidence that, first, AID-mediated SHM is targeted to the IgH locus by the cis-acting 3'RR and, second, that SHM within Ig genes does not imply parallel transcription. These results are reminiscent of those reported for 3' regulatory elements located in the chicken Ig light chain (Kothapalli et al., 2008; Blagodatski et al., 2009). Similarly to the IgH 3'RR, the DIVAC (diversification activator) cis-acting element is required for SHM at the chicken Ig light chain gene (Blagodatski et al., 2009) but does not function by increasing transcription (Kohler et al., 2012). Although high levels of transcription are not sufficient for robust SHM in IgL locus (Yang et al., 2006), separated mutational and transcriptional enhancers were recently reported for IgL genes (Kothapalli et al., 2011). The mechanism of how cis-regulatory sequences activate SHM in neighboring transcription units remains speculative. As hypothesized for DIVAC (Blagodatski et al., 2009), the IgH 3'RR might promote the formation of protein complexes that first bind AID and then hand it over to the neighboring transcription initiation complex.

Mutation in S_μ is severely compromised in 3'RR-deficient mice

Studies reported that S_μ targets SHM; mutational frequency peaked 5' of S_μ and decreased thereafter (Maul and Gearhart, 2010). We investigated whether deletion of the 3'RR abrogated this pattern of SHM. Because of high GC content and the repetitive nature of the S_μ sequence (Fig. S1), accurate PCR amplification across the region is known to be problematic. We thus cloned the entire I_μ-C_μ sequence (location of PCR primers in Fig. S1) and sequenced both the 5' and the 3' part of the PCR product encompassing S_μ. Experiments were

performed with B splenocytes of WT and 3'RR-deficient mice immunized orally with sheep red blood cells and intraperitoneally with LPS. A dramatic decrease ($P < 0.0001$, Mann–Whitney U test) of mutated sequences 5' to S_μ was found in 3'RR-deficient mice (14%, 5/36) as compared with WT (65%, 20/31; Fig. 1 A). The mutation frequency in 3'RR-deficient mice (7 mutations among 19,078 bp analyzed, 0.036%) was compared with WT (92 mutations among 20,934 bp analyzed, 0.44%) and showed a >90% reduction (Fig. 1, A and D). In agreement with previous results (Maul and Gearhart, 2010), no mutations were documented 3' to S_μ in WT nor in 3'RR-deficient mice (not depicted). ChIP experiments indicated that AID occupancy at the S_μ region was markedly reduced in 3'RR-deficient splenocytes as compared with WT (Fig. 2 G). Only background levels of immunoprecipitation were found both for 3'RR-deficient mice and AID-deficient mice, leading to the conclusion that AID binding to S_μ is totally impaired in 3'RR-deficient mice.

Concluding remarks

There have been several previous genomic alterations of the IgH 3'RR, notably through individual enhancer deletions (Manis et al., 1998; Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009; Bébin et al., 2010). Partial functional redundancies of the four 3'RR enhancers have long kept their role quite elusive, especially with regard to SHM. The complete deletion now clarifies that the 3'RR is mandatory for SHM. This major SHM defect paralleled a partly decreased IgH transcription, suggesting that elements beyond primary transcription accessibility are missing for recruitment of the SHM machinery onto the 3'RR-deficient IgH locus. The very low residual SHM suggests that no additional elements cooperate with the 3'RR for SHM. Although transcription is a prerequisite for several regulatory mechanisms controlling key stages in the B cell physiology, it is clearly not sufficient to ensure Ig locus accessibility to AID. The 3'RR-deficient mice will facilitate further elucidation of how the 3'RR “enhanceosome” or the 3'RR-dependent IgH locus 3D-conformation might regulate AID accessibility beyond transcriptional regulation.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Our research has been approved by the ethics committee review board of our university (Limoges, France) and hospital (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, CHU Dupuytren, Limoges, France). Generation of 3'RR-deficient mice has been previously reported (Vincent-Fabert et al., 2010) and was performed on a C57BL/6 background. Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Age-matched littermates (8–12 wk old) were used in all experiments. C57BL/6 mice were used as WT mice.

Cell cytometry and sorting procedures for SHM experiments.

Mouse immunizations were performed orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 µg LPS for 3 d. Single-cell suspensions from Peyer's patches were labeled with B220-APC-, PNA-FITC-, and Fas-PE-conjugated antibodies. Purification of B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells was realized on a FACS Vantage (BD). These cells were used for SHM analysis of V(D)J-rearranged fragments and Igκ light chain VJ-rearranged fragments and analysis of IgH and κ primary transcripts. Single-cell suspensions from

splenocytes were labeled with B220-APC- and PNA-FITC-conjugated antibodies for purification of B220⁺PNA^{high} B splenocytes. These cells were used for SHM analysis of S_μ.

DNA extraction and amplification for SHM experiments. Genomic DNA was extracted from sorted B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells. IgH V(D)J-rearranged fragments were amplified by PCR using the following primers and multistep programs: the forward primer 5'-GCGAAGCTTARGCCTGGG-RCTTCAGTGAAG-3', complementary to the VHJ558 segment, and the backward primer 5'-AGGCTCTGAGATCCCTAGACAG-3', corresponding to a sequence 517 bp downstream of the J_{H4} segment using 1 cycle at 98°C for 30 s, 33 cycles (98°C for 10 s, 67°C for 30 s, and 72°C for 90 s), and 1 cycle at 72°C for 10 min. Igk light chain VJ-rearranged fragments were amplified by PCR as previously reported (Xiang and Garrard, 2008) using the following primers and multistep programs: the forward primer 5'-GGCTG-CAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGRAC-3' (consensus for Vκ) and the backward primer 5'-AGCGAATTCAACTTAGGAGACAAAAGAGA-GAAC-3' (found 557 bp downstream of the J_{κ5} segment) using 1 cycle at 98°C for 30 s, 33 cycles (98°C for 10 s, 66°C for 30 s, and 72°C for 90 s), and 1 cycle at 72°C for 10 min. S_μ from B220⁺PNA^{high} B splenocytes was amplified by PCR using Herculase II DNA polymerase (Agilent Technologies) and the following primers and multistep programs: the forward primer 5'-CTCTGGCCCTGCTTATTGTTG-3' and the backward primer 5'-GAA-GACATTTGGGAAGGACTGACT-3' using 1 cycle at 95°C for 120 s, 40 cycles (95°C for 15 s, 61°C for 20 s, and 72°C for 180 s), and 1 cycle at 72°C for 180 s. The exact location of the PCR primers and the S_μ PCR product used for mutation analysis are shown in Fig. S1.

Cloning and sequencing. PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning vector system (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (PerkinElmer).

Transcript analysis. B cells from spleen of IgH 3'RR-deficient or WT mice were purified using CD43-coupled beads from Miltenyi Biotec according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was extracted using tri-reagent (Ambion). Real-time PCR was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents and analyzed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems). Transcripts were studied for Msh2 (reference Mn00500563-m1), Msh6 (reference Mn00487769-g1), UNG (reference Mn00449156-m1), POLη (reference Mn00453168-m1), REV1 (reference Mn00450983-m1), AID (reference Mn01184115-m1), and GAPDH (used for normalization of gene expression levels; reference Mm99999915-g1) as previously reported (Truffinet et al., 2007; Vincent-Fabert et al., 2009). B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells were used for analysis of IgH and κ primary transcripts. IgH primary transcripts (probe located in the intron between the last J_H and the intronic E_μ enhancer) were studied as previously reported (Tinguely et al., 2012): forward primer, 5'-TTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTG-3'; reverse primer, 5'-CCTAGACAGTTTATTTCCCAACTTCTC-3'; and probe, 5'-CCCTGAGGGAGCCG-3'. κ primary transcripts (probe located in the intron between the last J_κ and the intronic enhancer Eik): κ forward primer, 5'-ACCCCCGCGGTAGCA-3'; κ reverse primer, 5'-TCCTATCACTGT-GCCTCAGGAA-3'; and probe, 5'-CCCTTGCTCCGCGTGGACCA-3'. GAPDH was used for normalization of gene expression levels (reference Mm99999915-g1).

ChIP. Mice immunizations were performed orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 μg LPS for 3 d. CD19 magnetic cell-sorted splenic B cells were used for AID-ChIP experiments as previously described (Jeevan-Raj et al., 2011). For S_μ Q-PCR, data represent results obtained using two different primer pairs. S_μ forward 1 primer, 5'-TAAAT-GCGCTAAACTGAGGTGATTACT-3'; S_μ reverse 1 primer, 5'-CATCT-CAGCTCAGAACAGTCCAGTG-3' (Kuang et al., 2009); S_μ forward 2 primer, 5'-TAGTAAGCGAGGCTCTAAAAGCAT-3'; and S_μ reverse 2 primer, 5'-AGAACAGTCCAGTGTAGGCAGTAGA-3' (Pavri et al., 2010).

These primers were used with QuantiTect SYBR Green mix from QIAGEN. For J_{H4} experiments, two primers (UPL 3'J_{H4} forward, 5'-AGGGACTTTG-GAGGCTCAT-3'; and UPL 3'J_{H4} reverse, 5'-CTCCAACCTACAGC-CCCAACT-3') have been designed and were used in combination with UPL probe#19 and Roche LightCycler 480 Probes Master mix. Splenic B cells were purified by CD43 magnetic cell sorting from nonimmunized mice and cultured in vitro with 10 μg/ml LPS for 3 d and used for Pol II-ChIP experiments as previously described (Tinguely et al., 2012). PCR primers were those used for analysis of IgH primary transcripts (probe located in the intron between the last J_H and the intronic E_μ enhancer; see sequences above).

Online supplemental material. Fig. S1 shows S_μ sequence and location of primers for S_μ PCR experiments. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20130072/DC1>.

We thank S. Desforages and B. Remerand for help with animal care.

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; SL 220100601332), Conseil Régional du Limousin, and Agence Nationale de la Recherche (Projets Blanc 2011). C. Vincent-Fabert was supported by a grant from the ARC.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 10 January 2013

Accepted: 7 June 2013

REFERENCES

- Afshar, R., S. Pierce, D.J. Bolland, A. Corcoran, and E.M. Oltz. 2006. Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol.* 176:2439–2447.
- Bébin, A.G., C. Carrion, M. Marquet, N. Cogné, S. Lecardeur, M. Cogné, and E. Pinaud. 2010. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* 184:3710–3717. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901978>
- Blagodatski, A., V. Batrak, S. Schmidl, U. Schoetz, R.B. Caldwell, H. Arakawa, and J.M. Buerstedde. 2009. A *cis*-acting diversification activator both necessary and sufficient for AID-mediated hypermutation. *PLoS Genet.* 5:e1000332. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000332>
- Dunnick, W.A., J.T. Collins, J. Shi, G. Westfield, C. Fontaine, P. Hakimpour, and E.N. Papavasiliou. 2009. Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* 206:2613–2623. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091280>
- Featherstone, K., A.L. Wood, A.J. Bowen, and A.E. Corcoran. 2010. The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285:9327–9338. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.098251>
- Fukita, Y., H. Jacobs, and K. Rajewsky. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity.* 9:105–114. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80592-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80592-0)
- Giallourakis, C.C., A. Franklin, C. Guo, H.L. Cheng, H.S. Yoon, M. Gallagher, T. Perlot, M. Andzelm, A.J. Murphy, L.E. Macdonald, et al. 2010. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:22207–22212. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1015954107>
- Guo, C., H.S. Yoon, A. Franklin, S. Jain, A. Ebert, H.L. Cheng, E. Hansen, O. Despo, C. Bossen, C. Vettermann, et al. 2011. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature.* 477:424–430. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10495>
- Hackney, J.A., S. Misaghi, K. Senger, G. Garriss, Y. Sun, M.N. Lorenzo, and A.A. Zarrin. 2009. DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* 101:163–189. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01005-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01005-5)
- Henderson, A., and K. Calame. 1998. Transcriptional regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 16:163–200. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.163>
- Jeevan-Raj, B.P., I. Robert, V. Heyer, A. Page, J.H. Wang, F. Cammas, F.W. Alt, R. Losson, and B. Reina-San-Martin. 2011. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class

- switch recombination. *J. Exp. Med.* 208:1649–1660. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110118>
- Kohler, K.M., J.J. McDonald, J.L. Duke, H. Arakawa, S. Tan, S.H. Kleinstein, J.M. Buerstedde, and D.G. Schatz. 2012. Identification of core DNA elements that target somatic hypermutation. *J. Immunol.* 189:5314–5326. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202082>
- Kothapalli, N., D.D. Norton, and S.D. Fugmann. 2008. Cutting edge: a cis-acting DNA element targets AID-mediated sequence diversification to the chicken Ig light chain gene locus. *J. Immunol.* 180:2019–2023.
- Kothapalli, N.R., K.M. Collura, D.D. Norton, and S.D. Fugmann. 2011. Separation of mutational and transcriptional enhancers in Ig genes. *J. Immunol.* 187:3247–3255. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101568>
- Kuang, F.L., Z. Luo, and M.D. Scharff. 2009. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:5288–5293. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0901368106>
- Laurencikienė, J., V. Tamosiunas, and E. Severinson. 2007. Regulation of ϵ germline transcription and switch region mutations by IgH locus 3' enhancers in transgenic mice. *Blood.* 109:159–167. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-02-005355>
- Manis, J.P., N. van der Stoep, M. Tian, R. Ferrini, L. Davidson, A. Bottaro, and F.W. Alt. 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188:1421–1431. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.8.1421>
- Maul, R.W., and P.J. Gearhart. 2010. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. *Immunol. Res.* 47:113–122. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-009-8142-5>
- Morvan, C.L., E. Pinaud, C. Decourt, A. Cuvillier, and M. Cogné. 2003. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood.* 102:1421–1427. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-12-3827>
- Neuberger, M.S., and C. Rada. 2007. Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase η for A/T. *J. Exp. Med.* 204:7–10. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062409>
- Nitschke, L., J. Kestler, T. Tallone, S. Pelkonen, and J. Pelkonen. 2001. Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* 166:2540–2552.
- Pavri, R., A. Gazumyan, M. Jankovic, M. Di Virgilio, I. Klein, C. Ansarah-Sobrinho, W. Resch, A. Yamane, B. Reina San-Martin, V. Barreto, et al. 2010. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell.* 143:122–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.017>
- Perlot, T., F.W. Alt, C.H. Bassing, H. Suh, and E. Pinaud. 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:14362–14367. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507090102>
- Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science.* 336:931–934. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218692>
- Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogné. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity.* 15:187–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00181-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00181-9)
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2012. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287:8356–8360. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.341024>
- Sakai, E., A. Bottaro, L. Davidson, B.P. Sleckman, and F.W. Alt. 1999. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1526–1531. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.4.1526>
- Schatz, D.G., and Y. Ji. 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11:251–263. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2941>
- Terauchi, A., K. Hayashi, D. Kitamura, Y. Kozono, N. Motoyama, and T. Azuma. 2001. A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol.* 167:811–820.
- Tinguely, A., G. Chemin, S. Péron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogné, and L. Delpy. 2012. Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32:107–117. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06138-11>
- Truffinet, V., E. Pinaud, N. Cogné, B. Petit, L. Guglielmi, M. Cogné, and Y. Denizot. 2007. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a pre-dominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* 179:6033–6042.
- Tumas-Brundage, K.M., K.A. Vora, and T. Manser. 1997. Evaluation of the role of the 3' alpha heavy chain enhancer [3' alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* 34:367–378. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00065-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00065-5)
- Vincent-Fabert, C., V. Truffinet, R. Fiancette, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182:6926–6932. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900214>
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 116:1895–1898. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
- Xiang, Y., and W.T. Garrard. 2008. The Downstream Transcriptional Enhancer, Ed, positively regulates mouse Ig kappa gene expression and somatic hypermutation. *J. Immunol.* 180:6725–6732.
- Yang, S.Y., S.D. Fugmann, and D.G. Schatz. 2006. Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J. Exp. Med.* 203:2919–2928. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20061835>

Rouaud et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20130072/DC1>

B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

5,148 bp → ← 5,800 bp

JEM

Article 2

AID-induced C μ -C δ class switch recombination occurs independently of the IgH 3' regulatory region.

Pauline Rouaud*, **Alexis Saintamand***, Faten Saad, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné & Yves Denizot.

*Contribution équivalente

The Journal of Experimental Medicine, 2014, volume 211, numéro 5, pages 975-985.

Cet article est issu d'une étude visant à mieux comprendre un mécanisme encore peu connu chez la souris : la CSR vers IgD. Les cellules B matures naïves co-expriment à leur surface des BCR IgM et IgD, et doivent subir le mécanisme de CSR pour exprimer des IgG, IgE ou IgA. Il était largement admis que l'expression d'IgD n'était possible que par épissage alternatif d'un grand transcrit commun avec IgM. Cependant, quelques articles avaient décrit des hybridomes ou des cas de myélomes murins IgD⁺ présentant une délétion des exons C μ , suggérant l'existence d'une CSR vers IgD (Maki et al., 1981; Moore et al., 1981, 1985; Mountz et al., 1990). Chez l'Homme, quelques études avaient déjà mis en évidence l'existence d'un *switch* vers IgD dans un contexte normal ou tumoral (Gilliam et al., 1984; Owens et al., 1991; Kluin et al., 1995; Arpin et al., 1997, 1998). De manière surprenante, ce *switch* peut avoir lieu chez l'Homme *via* un mécanisme de CSR "classique" ou suite à une recombinaison homologue entre deux séquences similaires localisées en aval de J_H4 et en amont du C_H1 IgD (White et al., 1990). Enfin, une CSR vers IgD avait également été décrite chez le bovin (Xu et al., 2012a).

Chez l'Homme, ces cellules IgM/IgD⁺ sont principalement retrouvées dans les amygdales et les muqueuses. Elles présentent un phénotype de plasmablaste et expriment préférentiellement des Ig λ . Elles présentent également des marqueurs de cellules post-GC et un taux de SHM très élevé (Liu et al., 1996; Arpin et al., 1997, 1998). L'IgD sécrétée dans ces tissus joue un rôle pro-inflammatoire et intervient dans l'immunité antimicrobienne. Les IgD montrent notamment une forte affinité pour la bactérie *Moraxella catarrhalis* (*via* sa protéine MID, aussi appelée IgD binding protein), pour *Haemophilus Influenzae* (*via* sa capsule

polysaccharidique ou en se fixant sur la région constante de l'IgD) et plus généralement pour les LPS de bactéries Gram-négatives (Gjörloff Wingren et al., 2002; Jendholm et al., 2008; Chen et al., 2009; Singh et al., 2014). Il a également été démontré que ces cellules IgM⁻/IgD⁺ expriment fréquemment des Ig autoréactives (Zheng et al., 2004; Koelsch et al., 2007).

La connaissance de ce mécanisme de CSR reste cependant faible en comparaison des CSR "classiques" vers les autres isotypes. Ceci est particulièrement vrai chez la souris. Les rares articles évoquant ce sujet, s'ils décrivent l'existence de cellules ayant *switché* vers IgD, ne s'intéressent que peu ou pas au mécanisme de CSR en lui-même. Nous nous sommes donc intéressés à cette CSR particulière et à son déroulement chez la souris. Nous avons de plus mis à profit l'existence de notre modèle murin de délétion de la 3'RR pour étudier le rôle de cette dernière dans ce processus. La présence de cellules IgD^{high}/IgM^{low} sur le coté anti-mésentérique de l'intestin ainsi que l'existence du syndrome « hyper-IgD », caractérisé par un fort taux d'IgD sérique et une augmentation du volume des ganglions mésentériques, nous a poussé à rechercher des preuves de l'existence de la CSR vers IgD dans ces organes (Hamada et al., 2002; Oretti et al., 2006; Mulders-Manders and Simon, 2015).

Nous avons tout d'abord confirmé la présence d'une région "*switch-like*" nommée " $\sigma\delta$ ", localisée en amont des exons C δ . De telles séquences ont préalablement été décrites chez l'Homme et le bovin (Kluin et al., 1995; Xu et al., 2012a). Nous avons ensuite amplifié par PCR nichées des séquences correspondant à des jonctions S μ - $\sigma\delta$. Le clonage et le séquençage des amplicons a permis d'analyser le type de jonction (jonctions directes, microhomologies, insertions...) et donc de déterminer la voie de réparation utilisée (Stavnezer et al., 2010). Par comparaison avec les CSR "classiques" vers IgG1 et IgG3, la CSR vers IgD montre une fréquence plus importante de jonctions par microhomologie >5pb, ce qui suggère une réparation préférentielle par la voie de l'AEJ. La fréquence de mutations de part et d'autre de la jonction est également plus faible par rapport aux CSR "classiques", indiquant un recrutement moindre d'AID. L'impossibilité de détecter ces jonctions dans des souris AID^{-/-} confirme bien que ce *switch* est AID dépendant.

La CSR vers IgD semblant régulée différemment des autres CSR, nous avons donc cherché à savoir si elle est dépendante de la 3'RR. Nous avons amplifié et hybridé des jonctions S μ - $\sigma\delta$ dans des souris *Wt*, 3'RR KO et AID^{-/-}, ce qui a permis d'observer une augmentation du nombre de jonction en absence de 3'RR. Le même profil a été obtenu en recherchant les épisomes correspondant à la séquence délétée lors de la CSR, confirmant cette

augmentation. La technique de LM-PCR a également permis de montrer une augmentation de la fréquence de DSB dans la région $\sigma\delta$ chez les souris 3'RR KO.

L'analyse par cytométrie de ces cellules IgM-/IgD⁺ a montré qu'elles possèdent pour la plupart un phénotype de cellules pré-GC (B220⁺, GL7⁻, PNA^{low}, Fas⁻). En accord avec ce phénotype, le séquençage des régions variables de ces cellules a montré une absence de SHM sur les loci IgH et Igκ. Tous ces résultats suggèrent une activation T indépendante. Enfin, comme leur contrepartie chez l'Homme, ces cellules sont CD5⁺, CD11b⁻ et CD138⁻.

En résumé, notre étude a démontré que :

- La CSR vers IgD existe dans les ganglions mésentériques et est dépendante d'AID
- Les cellules possèdent un phénotype pré-GC et semblent activées de façon T indépendante.
- Le ciblage par AID semble moins important que lors des CSR "classique" d'où un taux de mutation plus faible autour des jonctions.
- Les jonctions utilisent majoritairement la voie de l'AEJ.
- La CSR vers IgD est régulée de façon 3'RR indépendante. Elle semble même augmentée dans les souris 3'RR KO.

Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region

Pauline Rouaud,¹ Alexis Saintamand,¹ Faten Saad,¹ Claire Carrion,¹ Sandrine Lecardeur,¹ Michel Cogné,^{1,2} and Yves Denizot¹

¹UMR CNRS 7276, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, 87025 Limoges, France

²Institut Universitaire de France, 75000 Paris, France

Classical class-switch recombination (cCSR) substitutes the C_μ gene with C_γ , C_ϵ , or C_α , thereby generating IgG, IgE, or IgA classes, respectively. This activation-induced deaminase (AID)-driven process is controlled by the IgH 3' regulatory region (3'RR). Regulation of rare IgD CSR events has been enigmatic. We show that $\mu\delta$ CSR occurs in mouse mesenteric lymph node (MLN) B cells and is AID-dependent. AID attacks differ from those in cCSR because they are not accompanied by extensive somatic hypermutation (SHM) of targeted regions and because repaired junctions exhibit features of the alternative end-joining (A-EJ) pathway. In contrast to cCSR and SHM, $\mu\delta$ CSR is 3'RR-independent, as its absence affects neither breakpoint locations in S_μ - and S_δ -like (σ_δ) nor mutation patterns at S_μ - σ_δ junctions. Although mutations occur in the immediate proximity of the $\mu\delta$ junctions, SHM is absent distal to the junctions within both S_μ and rearranged VDJ regions. In conclusion, $\mu\delta$ CSR is active in MLNs, occurs independently of 3'RR-driven assembly, and is even dramatically increased in 3'RR-deficient mice, further showing that its regulation differs from cCSR.

CORRESPONDENCE

Yves Denizot:
yves.denizot@unilim.fr

Abbreviations used: 3'RR, 3' regulatory region; A-EJ, alternative end-joining; AID, activation-induced deaminase; cCSR, classical class-switch recombination; C-NHEJ, classical nonhomologous end joining; DSB, double-strand break; GC, germinal center; LM-PCR, ligation-mediated PCR; MLN, mesenteric LN; SHM, somatic hypermutation.

After functional V(D)J recombination, bone marrow immature B cells express a BCR made up of surface IgM. In secondary lymphoid organs, mature B cells simultaneously express surface IgD of the same specificity as surface IgM through alternative splicing of a pre-mRNA composed of V(D)J and both C_μ and C_δ heavy chain constant exons (Moore et al., 1981; Preud'homme et al., 2000; Chen and Cerutti, 2010). After encountering antigen, in adequate lymphoid tissue structures providing accessory signals (direct interactions with T cells and follicular dendritic cells and binding of cytokines secreted by such cells), activated B cells undergo classical class-switch recombination (cCSR) and substitute the C_μ gene with C_γ , C_α , or C_ϵ , thereby generating secondary IgG, IgA, and IgE BCR and antibody classes with the same antigenic specificity but new effector functions. This recombination targets specific stretches of repetitive DNA (S regions) preceding C_μ and all C_γ , C_α , and C_ϵ genes and requires the DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID; Pavri and Nussenzweig, 2011). Transcription and, to

an even higher extent, accessibility of the IgH locus S regions to cCSR is under the control of the IgH 3' regulatory region (3'RR), located downstream of C_α , and encompassing the four transcriptional enhancers $hs3a$, $hs1,2$, $hs3b$, and $hs4$ (Vincent-Fabert et al., 2010a; Pinaud et al., 2011). Genomic disruption or complete deletion of the 3'RR in the mouse abrogates cCSR to all IgG, IgA, and IgE classes (Vincent-Fabert et al., 2010a,b; Pinaud et al., 2011). Recently the 3'RR was also reported to be transcribed and itself undergo AID-mediated mutation and recombination around phylogenetically conserved switch-like DNA repeats, highlighting its close functional partnership with AID (Péron et al., 2012).

Despite the absence of a repetitive S region upstream of C_δ and similar to class switching from IgM to IgG, IgA, and IgE, some CD38⁺ human B cells from tonsils carry an IgH locus switched to IgD expression after an AID-mediated deletion

P. Rouaud and A. Saintamand contributed equally to this paper.

© 2014 Rouaud et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

of C_μ (Arpin et al., 1998; Brandtzaeg and Johansen, 2005; Johansen et al., 2005; Chen et al., 2009). Secreted IgD originating from such cells with CSR from C_μ to C_δ ($\mu\delta$ CSR) enhances immune surveillance and can exert proinflammatory and antimicrobial effects (Chen et al., 2009). Although there is no canonical switch region 5' to the C_δ gene in mammals (Preud'homme et al., 2000; Chen and Cerutti, 2010), rudimentary S_δ -like (σ_δ) sequences have been described at C_μ - C_δ junctions but CSR from μ to δ stands as a rare event whose regulation is obscure (Chen and Cerutti, 2010). To explore the role of the 3'RR on such C_μ - C_δ recombinations, in the context of the endogenous locus, we analyzed IgH 3'RR-deficient mice lacking the 30-kb extent of the 3'RR, a deletion which we previously characterized as inducing a severe cCSR defect toward IgG, IgA, and IgE (Vincent-Fabert et al., 2010b), a severe somatic hypermutation (SHM) defect (Rouaud et al., 2013) but with normal V(D)J recombination (Rouaud et al., 2012).

RESULTS

IgD secretion in mice occurs at low levels and is poorly understood. Germline transcription of I_μ - C_μ enrolls the S_μ regions as a substrate for DNA modification by the cCSR machinery including AID (Chen and Cerutti, 2010). I_μ - C_δ transcripts can originate either from alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_μ and C_δ exons or from primary C_δ transcripts after $\mu\delta$ CSR. Fig. 1 schematizes these processes and locates PCR primers and probes used in this study.

$\mu\delta$ CSR occurs in normal mesenteric LNs (MLNs) of *wt* mice and 3'RR-deficient mice

$\mu\delta$ CSR is currently not documented in mice (Chen and Cerutti, 2010). Although little is known about the role of soluble IgD in physiology, a well-known inflammatory disease in humans features high serum IgD levels and was thus called hyper-IgD syndrome, a disease also featuring enlargement of MLNs (Oretti et al., 2006). In a search for IgD⁺IgM⁻ cells after $\mu\delta$ CSR in *wt* mice, we thus focused our attention on MLN B cells. S regions consist of tandem repeats of short G-rich sequences. While readily showing S_μ repeats, dot plot analysis of the mouse DNA fragment encompassing the E_μ enhancer to C_δ only revealed few DNA repeats upstream of C_δ in a short 0.5-kb-long region that was thereby named σ_δ (Preud'homme et al., 2000; Fig. 2 A). Using a nested PCR-based strategy (location of primers in Fig. 1) followed by Southern blotting (location of the probe in Fig. 1) of PCR products, we were able to detect S_μ - σ_δ junctions as a result of S_μ to σ_δ CSR (Fig. 2 B). We definitely authenticated S_μ - σ_δ junctions by cloning them and analyzing their sequences (Fig. 2 C and Table S1). Because 3'RR-deficient mice are known to be almost completely defective for cCSR (Vincent-Fabert et al., 2010b), we also checked them for $\mu\delta$ CSR. To our surprise, Southern blotting of PCR product revealed the presence of S_μ - σ_δ junctions as a result of S_μ to σ_δ CSR (Fig. 2 B). These junctions were again authenticated by cloning and sequencing (Fig. 2 C and Table S1).

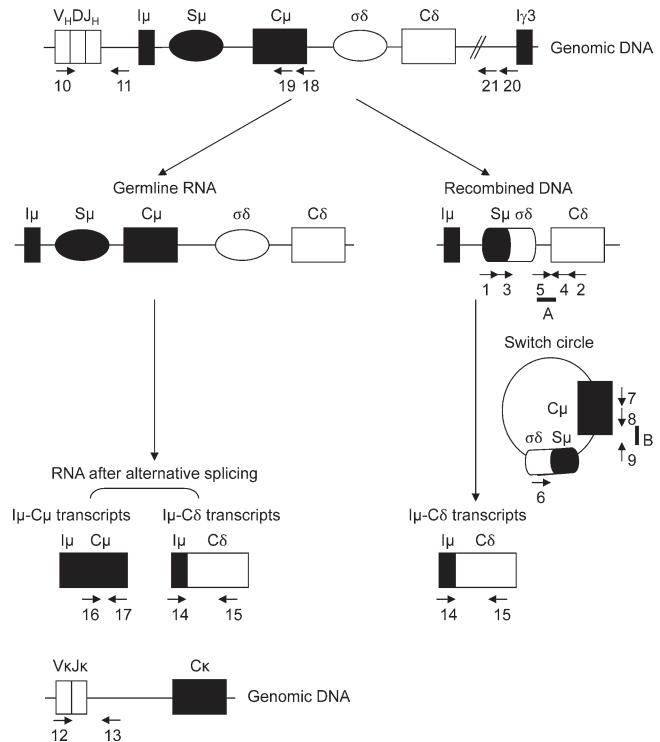


Figure 1. Two pathways for IgD synthesis. IgD can originate either from the alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_μ and C_δ exons (left) or from primary C_δ transcripts after $\mu\delta$ CSR (right). CSR from S_μ to σ_δ includes germline I_μ - C_μ and I_μ - C_δ transcripts and σ_δ - S_μ switch circles. Arrows located primers used in the study. Numbers and letters refer to the indicated primers and probes, respectively, as reported in Materials and methods.

Molecular features of $\mu\delta$ CSR junction sequences

The locations of S_μ - σ_δ breaks in S_μ and σ_δ for *wt* mice and 3'RR-deficient animals are reported in Fig. 2 D. Among S_μ - σ_δ junctions in *wt* mice (Fig. 2 C and Table S1), 13/21 (61.9%) showed 1–8-bp-long junctional microhomology. Complex junctions were also frequent (6/21, 28.6%). Similarly to *wt* mice, junctions with short nucleotide insertions and complex junctions were found in 3'RR-deficient mice. Junctions with microhomologies 1–8 bp long represented 45.7% (16/35) of junctions (Fig. 2 C and Table S1). Complex junctions represented 31.4% (11/35) of junctions. Direct S_μ - σ_δ joining was slightly increased in 3'RR-deficient mice (7/35, 20%) as compared with *wt* mice (2/21, 9.2%). To compare $\mu\delta$ CSR junctions cloned from MLN cells from *wt* mice with cCSR junctions, splenocytes from *wt* mice were stimulated with LPS or LPS + IL4 to generate C_μ - $C_{\gamma3}$ and C_μ - $C_{\gamma1}$ cCSR, respectively (Vincent-Fabert et al., 2009). Sequences of S_μ - $C_{\gamma3}$ and S_μ - $C_{\gamma1}$ junctions resulting from S_μ to $S_{\gamma3}$ and $S_{\gamma1}$ cCSR were reported in Fig. 2 C and Table S1. Features of S_μ - S_γ CSR junctions (i.e., relative frequencies of direct joints, microhomologies, insertions, and complex junctions) were similar to those classically reported (Stavnezer et al., 2010). Sequences from S_μ - σ_δ junctions of *wt* mice showed strikingly different features in that they more rarely exhibited a direct joining (2/21, 9.5%)

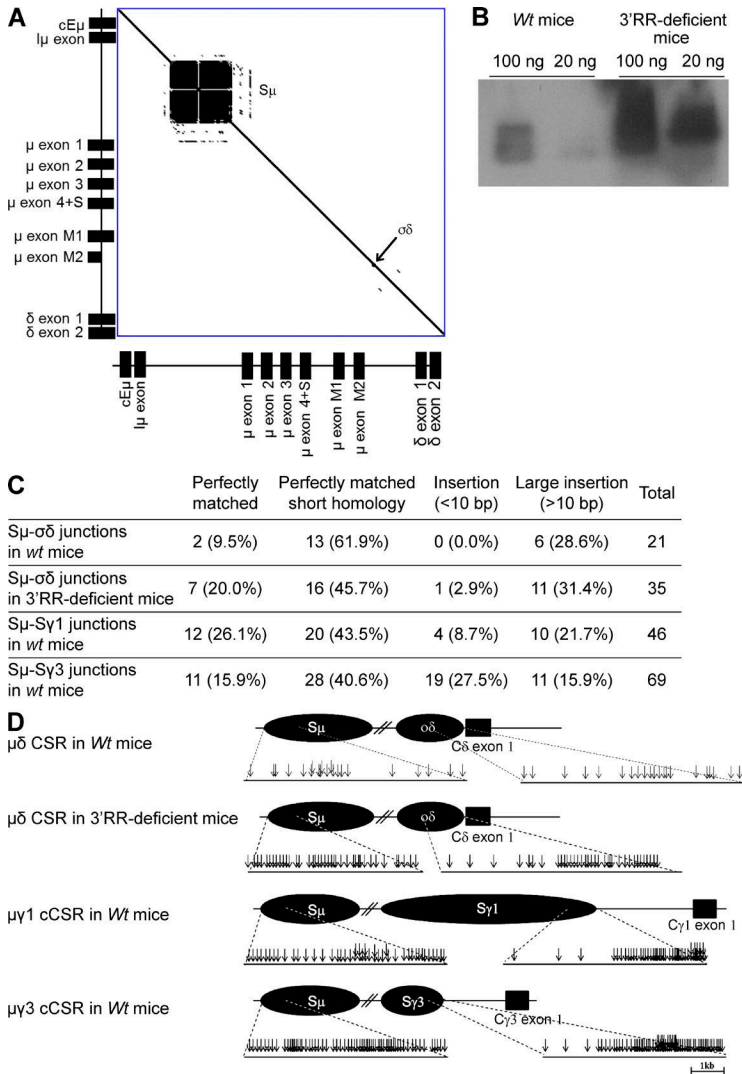


Figure 2. MLN B cells undergo $\mu\delta$ CSR. (A) DNA dot plot analysis of the genomic sequence encompassing a fragment from the E μ enhancer to the δ exon 2 from a 129 *wt* mouse (GenBank accession no. AJ851868.3). The sequence was compared with itself and dots off the diagonal represent repetitive patterns within the sequence. S μ and $\sigma\delta$ regions are indicated. (B) Southern blot analysis of S μ -C δ junctions amplified by PCR and hybridized with a 5'C δ probe from MLN B cells of 3'RR-deficient mice and *wt* mice. 100 and 20 ng DNA were used for PCR experiments. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) $\mu\delta$ junctions obtained from *wt* mice (data are pooled from 13 independent experiments with 1 mouse per experiment) and 3'RR-deficient mice (data are pooled from 10 independent experiments with 1 mouse per experiment) were cloned and sequenced. Percentages of junctions with insertion and junctional microhomology are reported. $\mu\gamma$ 1 and $\mu\gamma$ 3 junctions from *wt* mice (data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse per experiment) obtained after in vitro LPS \pm IL4 stimulation of splenocytes are reported. The sequenced junctions depicted from all the mice combined. (D) Location of S μ - $\sigma\delta$ breaks in 13 *wt* and 10 3'RR-deficient mice and S μ -S γ 1 and S μ -S γ 3 breaks during in vitro cCSR in 6 *wt* mice (same junctions and mice as in Fig. 2C).

than either S μ -S γ 1 (12/46, 26.1%) or S μ -S γ 3 (11/70, 15.9%) junctional sequences. Apart from that, the location of S μ breaks was similar in C μ -C δ , C μ -C γ 1, and C μ -C γ 3 junctions (Fig. 2 D). Finally, the cloned $\sigma\delta$ breaks were mostly located in the 3' part of the $\sigma\delta$ region similar to breaks in the downstream part of S γ 1 and S γ 3 for cCSR junctions (Fig. 2 D). The increased representation of DNA breaks in the 5' part of S μ and the 3' part of $\sigma\delta$ or S γ might involve a methodological bias whereby PCR cloning of the shortest recombined DNA segment would be favored.

Identical phenotype of IgD⁺IgM⁻ B cells in 3'RR-deficient and *wt* mice

Flow cytometry analysis indicated that IgD⁺IgM⁻ B cells accounted for only \sim 0.2% of total MLN cells in *wt* mice (Fig. 3 A). Consistent with published human data (Chen et al., 2009), a low percentage of IgD⁺IgM⁻ B cells expressed CD138 (syndecan-1), a hallmark of mature plasma cells (Fig. 3, B and C). Furthermore, the vast majority of IgD⁺IgM⁻ B cells did not express surface B220, CD11b, CD19, CD21, and CD23 markers which

are usually down-regulated by differentiated plasma cells (Fig. 3, B and C). IgD⁺IgM⁻ B cells also lacked PNA and GL7 staining and thus differed from germinal center (GC) B cells (Fig. 3 C). In contrast to human IgD⁺IgM⁻ B cells (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009), no bias for surface λ -light chain was found (not depicted). Similarly to human IgD⁺IgM⁻ B cells (Chen et al., 2009), mouse IgD⁺IgM⁻ B cells expressed CD5, an activation-induced B cell molecule (Fig. 3, B and C), and had a low proliferation rate (Ki67 index of \sim 50%; Fig. 3 C). IgD⁺IgM⁻ B cells were not detected in splenocytes, bone marrow B cells, and circulating B cells of *wt* mice (unpublished data). Flow cytometry analysis indicated the presence of IgD⁺IgM⁻ B cells in MLNs of 3'RR-deficient mice and that they accounted for \sim 2% of total MLN cells (Fig. 3 A), i.e., a 10-fold increase as compared with *wt* mice. Increased IgD switching was also confirmed after Southern blotting of S μ - $\sigma\delta$ junctions (Fig. 2 B). Besides their increased abundance, IgD⁺IgM⁻ B cells from 3'RR-deficient animals qualitatively differed from those in *wt* mice by showing a lower expression of the B cell surface markers B220, CD19, CD21, and CD23 (Fig. 3, B and C), although

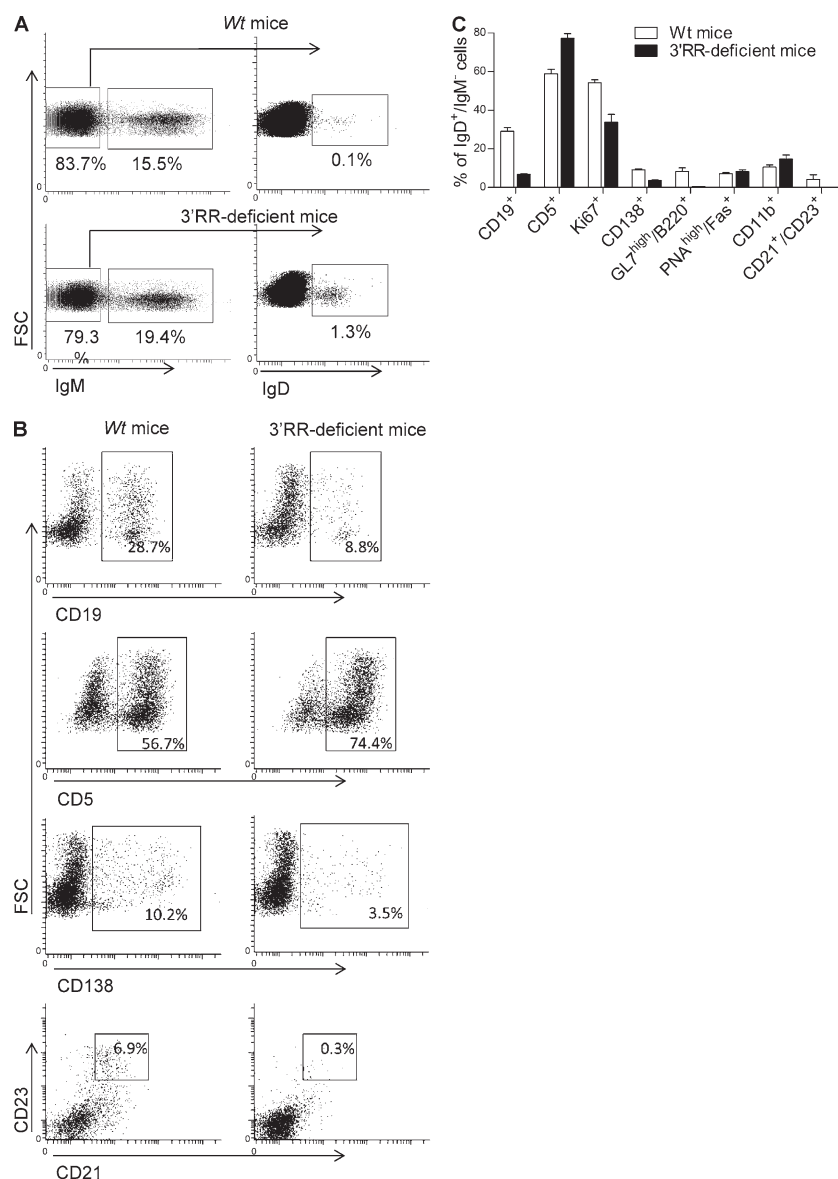


Figure 3. IgD⁺IgM⁻ B cell phenotype. (A) Flow cytometry analysis of IgM⁻IgD⁺ cells in MLN of wt mice and 3'RR-deficient mice. Cells were fixed and permeabilized before IgM and IgD staining. Cells were first gated on IgM⁻ cells and second on IgD⁺ cells highlighting the presence of IgM⁻IgD⁺ cells. Plots are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (B) Cytometry analysis of CD19, CD5, CD138, and CD23/CD21 cell surface markers in IgD⁺IgM⁻ cells from wt mice and 3'RR-deficient mice. Plots are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) Percentage of mouse IgD⁺IgM⁻ cells expressing CD19, CD5, Ki67, CD138, GL7/B220, PNA/Fas, CD11b, and CD21/CD23 in wt and 3'RR-deficient mice. Data are the mean \pm SEM from 6 independent experiments with 1 mouse per group.

they overwhelmingly (80%) expressed CD5 and poorly proliferated (<40% were Ki67⁺) as for wt IgD⁺IgM⁻ cells. Due to their low levels in MLNs, IgD⁺IgM⁻ B cells did not show up in wt mice using immunohistochemistry but were detected in 3'RR-deficient mice. In agreement with their PNA⁻ and GL7⁻ status, IgD⁺IgM⁻ cells were located in the marginal zone of GC (Fig. 4 A) and had a typical ovaloid-elongated plasma cell shape, medium to large size, and an abundant cytoplasm containing C δ IgH chains (Fig. 4 A). In contrast to humans (Chen et al., 2009), and confirming results with wt mice, we did not find any bias in the κ^+/λ^+ ratio when specifically studying those cells that express IgD in the absence of IgM expression (Fig. 4 B). Similarly to wt mice, such cells were not detected in blood, bone marrow, spleen, and Peyer's patches of 3'RR-deficient mice (unpublished data). A large fraction of B cells from the anti-mesenteric wall of the mouse small intestine displays an IgD⁺IgM⁻ phenotype (Hamada et al., 2002). We confirmed

the presence of IgD⁺ B cells by immunostaining all along the mouse small intestine but, again, more noticeably in 3'RR-deficient mice than in wt mice (Fig. 4 C).

$\mu\delta$ CSR has numerous characteristics of cCSR

To ensure whether the IgD⁺ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR, PCR analysis of $\mu\delta$ CSR in sorted IgD⁺IgM⁻ cells (from three mice) was performed in 3'RR-deficient mice (where these cells are more abundant and accessible to cell sorting). After cloning and sequencing we detected 11 different $\mu\delta$ sequences among 22 analyzed sequences (i.e., 50%). No junctions were found with sorted IgD⁻IgM⁻ cells, reinforcing the hypothesis that the IgD⁺IgM⁻ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR. Real-time PCR analysis indicated a dramatic decrease (62%, $P = 0.005$, Mann-Whitney U test) of C μ transcripts in sorted IgD⁺IgM⁻ cells as compared with sorted IgD⁺IgM⁺ cells, reinforcing the hypothesis that the IgD⁺IgM⁻ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR

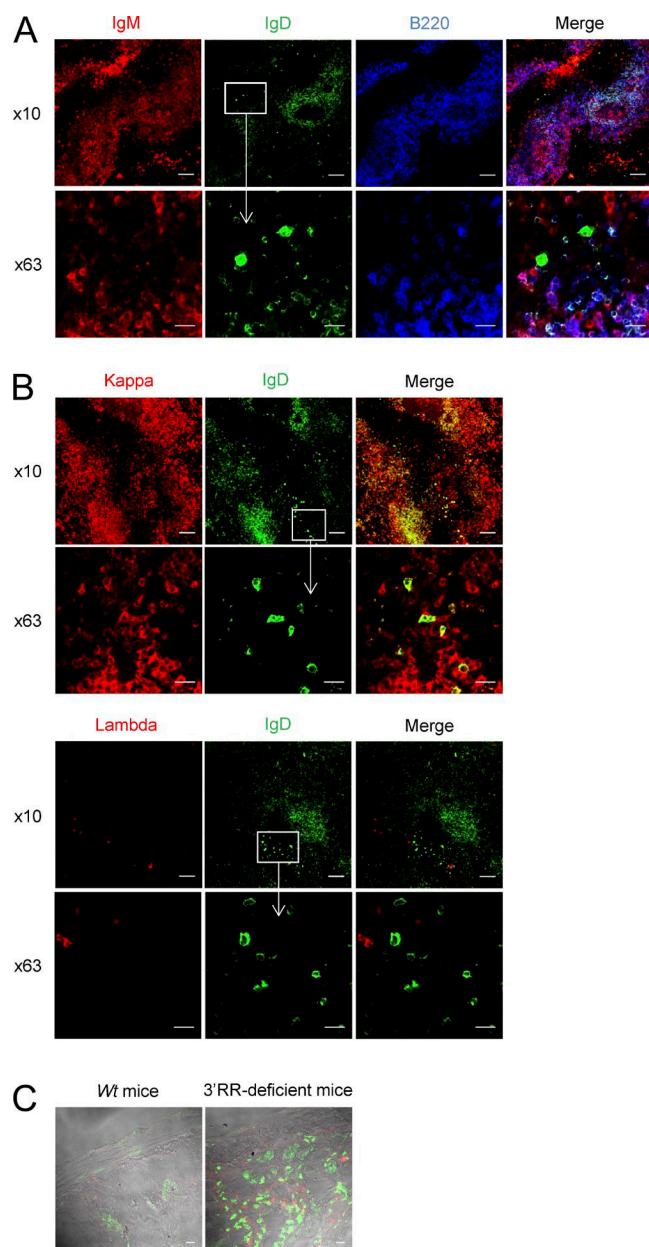


Figure 4. Immunohistochemistry analysis of IgD⁺IgM⁻ cells. (A) MLN tissue of 3'RR-deficient mice stained for IgM (red), IgD (green), and B220 (blue). Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per experiment. Bars: (10 \times) 100 μ m; (63 \times) 10 μ m. (B) MLN tissue stained for IgD (green), κ light chain (red), and λ light chain (red) in 3'RR-deficient mice. Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per experiment. Bars: (10 \times) 100 μ m; (63 \times) 10 μ m. (C) Intestine tissue stained for IgD (green) and IgM (red) in 3'RR-deficient mice and wt animals. Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per group. Bar, 100 μ m.

(Fig. 5 A). During CSR, there are abundant double-strand breaks (DSBs) in S_{μ} . A fraction of these DSBs may be joined to rare DSBs in other parts of the genome, especially within flanking regions on the same chromosome. To demonstrate a specific association of $\sigma\delta$ with $\mu\delta$ CSR, PCR analysis was performed

with other reverse PCR primers (location in Fig. 1) corresponding to C_{μ} and a region between C_{δ} and $I_{\gamma 3}$. Using these primers, we were unable to detect any $\mu\delta$ junctions (out of 200 independent junk sequences analyzed) in MLN DNA of four 3'RR-deficient mice with detectable $\mu\delta$ CSR, demonstrating that the joining between S_{μ} and $\sigma\delta$ represents a specific recombination event. Using a PCR amplification (location of primers in Fig. 1), followed by Southern blotting (location of the probe in Fig. 1), we identified extrachromosomal $\sigma\delta$ - S_{μ} circles in MLN B cells of 3'RR-deficient mice (Fig. 5 B), indicating ongoing $\mu\delta$ CSR and a looping-out and deletion mechanism analogous to cCSR (in conditions where ongoing $\mu\delta$ CSR was not detectable in MLN DNA from wt mice). The identity of the PCR product was confirmed by sequencing (location of primers in Fig. 1; not depicted). The hallmark of cCSR is its dependence on AID for DSBs formation in S regions. Ligation-mediated PCR (LM-PCR) highlighted the presence of DSBs in $\sigma\delta$ in wt mice and 3'RR-deficient mice but not in AID-deficient mice (Fig. 5 C). Using the same experimental strategy as for wt and 3'RR-deficient mice, we were unable to detect any S_{μ} - $\sigma\delta$ junction in genomic DNA from MLNs of AID-deficient mice by Southern blotting of PCR products designed to amplify such junctions (Fig. 5 D). Despite the lack of significant hybridization, we further tried to clone potential junctions from AID-deficient mice (by the same protocol as for wt mice) and failed to identify any (out of 288 independent junk sequences analyzed) indicating that $\mu\delta$ CSR in mice requires AID as previously suggested by analyses in human AID-deficient patients (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009). Finally, an I_{μ} - C_{δ} transcript was previously identified in human (Chen et al., 2009). Real-time PCR analysis confirmed its presence not only in IgD⁺IgM⁺ (where it can originate from alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_{μ} and C_{δ} exons) but also in IgD⁺IgM⁻ where it is the reflect of the post-IgD CSR transcription (Fig. 5 E).

Mutations in IgD⁺IgM⁻ cells

Interactions with cognate antigens recruit activated B cells into GC and can induce AID-mediated modifications. These include SHM in V(D)J exons for the generation of high-affinity antibodies and cCSR (Henderson and Calame, 1998; Durandy, 2003; Hackney et al., 2009). cCSR and SHM are linked to transcription, dependent from some common actors, and both blocked by AID deficiency. SHM can also be considered as the usual mark for antigen-experienced B cells having participated to a GC reaction (Chan and Brink, 2012). We purified IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice (where these cells are more abundant and accessible to cell sorting) to evaluate V κ J κ SHM and identify them as pre- or post-GC B cells. To stimulate SHM, mice were immunized both orally with sheep red blood cells and intraperitoneally with LPS (i.e., in conditions known to yield in vivo activated spleen and Peyer's patches B cells with V κ J κ SHM both in wt and 3'RR-deficient mice; Péron et al., 2012; Rouaud et al., 2013). Rearranged IgH VDJ and V κ J κ regions from MLN IgD⁺IgM⁻ cells of 3'RR-deficient mice were cloned and sequenced. No SHM

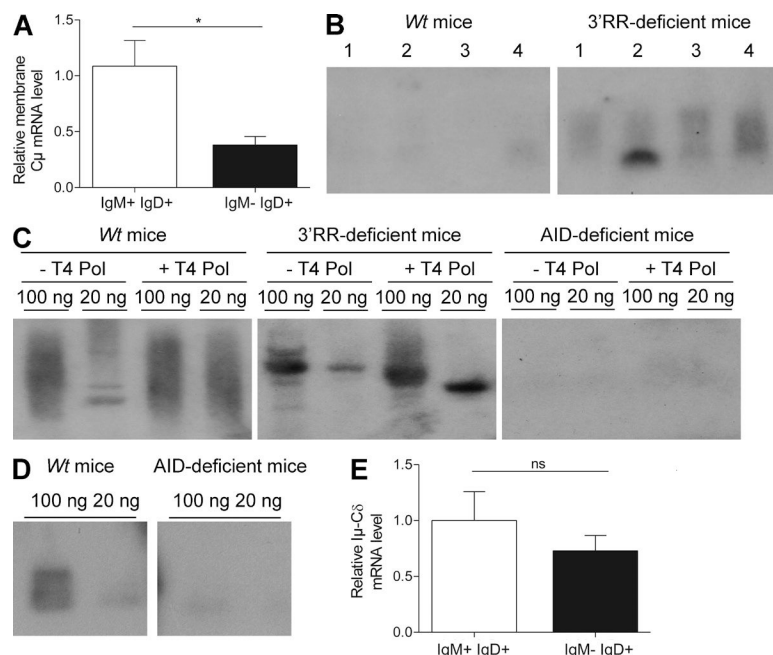


Figure 5. $\mu\delta$ CSR in 3'RR-deficient mice. (A) Real-time PCR analysis of membrane C_{μ} transcripts in sorted IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice. Data are the mean \pm SEM of 7 independent experiments with 1 mouse and 8 independent experiments with 1 mouse for IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells, respectively. *, $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test). (B) Southern blot analysis of σ_{δ} - S_{μ} switch circles amplified by PCR and hybridized with a C_{μ} -labeled probe from MLN B cells of 3'RR-deficient and wt mice. Results from four mice (lines 1–4) in each group are reported. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) LM-PCR. Genomic DNA from wt, 3'RR-deficient, and AID-deficient mice were left untreated or treated with T4 DNA polymerase (T4 Pol), ligated with T4 DNA ligase and probed for double-stranded breaks in $\sigma\delta$ after by semi-nested PCR. Reactions with 100 and 20 ng DNA are shown. Data are representative of 6 independent experiments each with 1 mouse per genotype. (D) Southern blot analysis of S_{μ} - C_{δ} junctions amplified by PCR and hybridized with a 5' C_{δ} probe from MLN B cells of wt mice and AID-deficient mice. 100 and 20 ng DNA were used for PCR experiments. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (E) Real-time PCR analysis of I_{μ} - C_{δ} transcript in sorted IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice. Data are of the mean \pm SEM of 6 independent experiments with 1 mouse and 8 independent experiments with 1 mouse for IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells, respectively. ns = not significant.

could be documented out of 90 VDJ sequences analyzed (3 mutations among 68,582 bp analyzed, 0.0044%) and 58 κ sequences analyzed (7 mutations among 36,134 bp analyzed, 0.0194%). Although the absence of SHM in VDJ rearranged region was expected in 3'RR-deficient mice recently demonstrated with and IgH locus-specific SHM defect (Rouaud et al., 2013), the lack of SHM in the κ light chain locus clearly indicate that those B cells with $\mu\delta$ CSR have not undergone conventional antigen-driven maturation as usually occurring into GC. By comparison, 3'RR-deficient animals recently analyzed after the same immunization protocol showed a >70-fold higher (1.39%) SHM rate in V κ J κ segment from Peyer's patches GC B cells (Rouaud et al., 2013). The lack of mutation in VDJ segments fitted well with their PNA⁻GL7⁻ status and their localization in the marginal zone of GC. Contrasting with mice, human IgD⁺IgM⁻ had extensive SHM in their IgV genes that indicated their clonal relatedness (Arpin et al., 1998). Mouse IgD⁺IgM⁻ had no SHM in their IgV genes and the use of a J_{H4} probe on Southern blots from IgD⁺IgM⁻ cell DNA revealed no rearranged bands in addition to the germline band indicating no potential clonal relatedness (unpublished data). We finally analyzed mutations during $\mu\delta$ CSR in wt mice as compared with cCSR to find if intensity of AID attack is similar between them. The mutation frequency at S_{μ} breakpoints and 5' to S_{μ} breakpoints were lower in $\mu\delta$ CSR than in IgG₁ and IgG₃ cCSR (although the latter control was chosen using in vitro conditions poorly inducing SHM; Fig. 6, A and B). A decrease of 25 and 52% in the frequency of mutations in the S_{μ} donor region was found during $\mu\delta$ CSR as

compared with IgG₃ and IgG₁ cCSR, respectively. The numbers of mutations at σ_{δ} breakpoints and 3' to σ_{δ} breakpoints were also much lower than in target S_{γ} region of cCSR (a decrease of 89 and 86% of those found in $S_{\gamma 1}$ and $S_{\gamma 3}$, respectively; Fig. 6, A and B). Thus, not only the S_{μ} donor region but also the σ_{δ} acceptor region implicated in $\mu\delta$ CSR exhibited lower AID-induced mutations than S_{μ} , $S_{\gamma 1}$, and $S_{\gamma 3}$ during IgG₁ and IgG₃ cCSR. Interestingly, the pattern of mutations at S_{μ} - σ_{δ} junctions, 5' to S_{μ} , and 3' to σ_{δ} was similar in wt mice and 3'RR-deficient animals (Fig. 6 B), showing that the absence of the 3'RR did not affect the AID-targeting at the S_{μ} donor and σ_{δ} acceptor regions during $\mu\delta$ CSR.

DISCUSSION

cCSR is a very complex process during which accessibility to recombination is regulated by both cis-acting factors (such as germline I promoters and 3'RR enhancers) and trans-acting factors (most of which are induced by cytokine-dependent signals and/or B cell activation; Stavnezer et al., 2010; Boboila et al., 2012). Analysis of DNA sequence at or around the recombination sites has helped us to understand the mechanisms first generating DSBs after targeting of S regions by AID and then allowing synapsis and repair of chromosomal breaks mostly through a classical nonhomologous end joining (C-NHEJ) pathway or to a lower extent through the alternative end-joining (A-EJ) pathway (Yan et al., 2007; Boboila et al., 2012). Although various disruptions of the 3'RR partially compromised cCSR (Cogné et al., 1994; Manis et al., 1998; Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009; Bébin et al., 2010), its complete

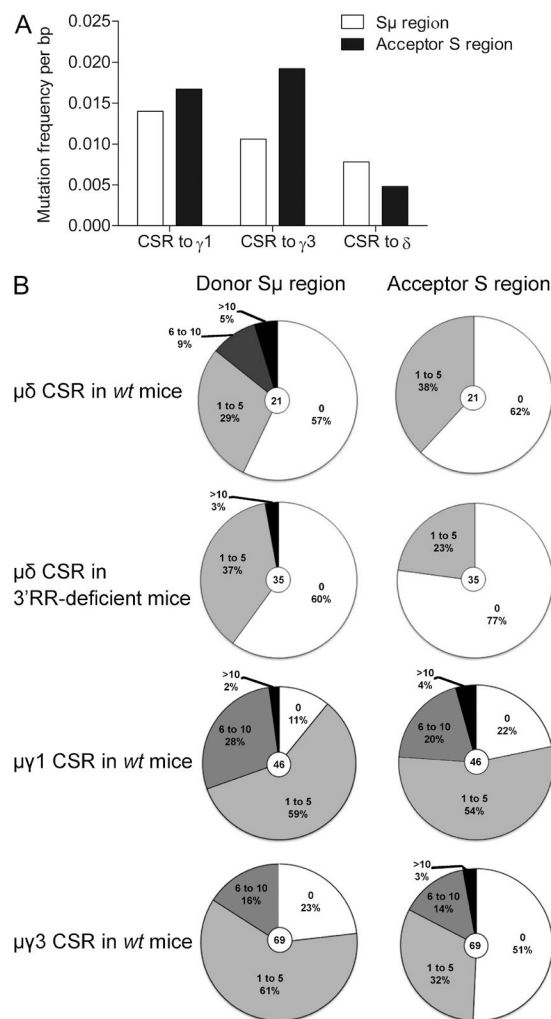


Figure 6. Mutation in S_μ and σ_δ during $\mu\delta$ CSR. Mutation frequency in the donor region (S_μ) and the acceptor region (σ_δ , S_{γ_1} , or S_{γ_3}) during $\mu\delta$ CSR and cCSR. (A) Mutation frequency per mutated bp. 46 S_μ - C_{γ_1} , 69 S_μ - C_{γ_3} , and 21 S_μ - C_δ junctions from wt mice were investigated. S_μ - C_{γ_1} and S_μ - C_{γ_3} junctions were obtained after in vitro stimulation of splenocytes from wt mice (data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse). S_μ - C_δ junctions were obtained after genomic extraction of MLN from wt mice (data are pooled from 13 independent experiments with 1 mouse). (B) Number of mutation in each S acceptor and S donor regions. 35 S_μ - C_δ junctions were obtained after genomic extraction of MLN from 3'RR-deficient mice (data are pooled from 10 independent experiments with 1 mouse).

deletion has clarified its mandatory role for cCSR toward IgG, IgA, and IgE isotypes (Vincent-Fabert et al., 2010b) as well as for SHM in rearranged VDJ exons (Rouaud et al., 2013).

Phylogenetic studies indicate that IgD is as ancient as IgM but, in contrast to IgM, IgD is evolutionarily labile showing, for instance, many duplications/deletions of domains and splice forms (Ohta and Flajnik, 2006; Rauta et al., 2012). Due to the lack of an authentic S_δ region, B cells exclusively expressing IgD are extremely rare in humans and almost absent in mice (Owens et al., 1991). Our study clearly shows that

despite the lack of canonical S_δ region, CSR from μ to δ occurs in MLNs from wt mice. Sequences of $\mu\delta$ CSR junctions reveal a lower percentage of direct end junctions in $\mu\delta$ CSR than in cCSR together with a higher percentage of junctions with either microhomologies between recombined ends or showing insertions of various lengths at the recombination site. Notably, this pattern is strongly reminiscent of the junctions affected by the A-EJ pathway and previously reported during cCSR in B cells lacking key components of the C-NHEJ pathway, its main characteristic being a dramatic reduction of CSR direct joints and frequent junctions with microhomologies and insertions (Yan et al., 2007). Although the A-EJ pathway has only recently been shown to contribute to cCSR, it has been shown that in the absence of C-NHEJ, cCSR can be performed by A-EJ at up to 50% of wt levels (Yan et al., 2007). Notably, the same A-EJ-based pattern of junctions is also observed when referring to a few mouse IgD-secreting hybridomas documented in the past (Owens et al., 1991).

Similarly to cCSR, the absence of $\mu\delta$ CSR in AID-deficient mice confirms it also requires AID. The hallmark of CSR is its dependence on AID for DSBs formation in S regions. LM-PCR experiments found the presence of DSBs in σ_δ in wt mice and 3'RR-deficient mice but not in AID-deficient mice. $\mu\delta$ CSR is also AID-dependent in human (Chen et al., 2009). However, this does not imply that all IgD-producing plasma cells have undergone $\mu\delta$ CSR. Indeed, serum IgD persists and is even augmented in some AID-deficient patients, probably as a result of the activation of an alternative pathway involving the emergence of plasma cells that produce both IgM and IgD via alternative splicing, particularly at mucosal sites (Chen et al., 2009). Our data indicated that during $\mu\delta$ CSR the S_μ and (still more clearly) the σ_δ acceptor region are less actively targeted by AID than S_μ , S_{γ_1} , and S_{γ_3} during IgG₁ and IgG₃ cCSR. This suggests, aside from differences in junction diversity, that $\mu\delta$ CSR is regulated differently from cCSR. Individual S regions range in size from 10 kb for S_{γ_1} (IgG₁ being the most abundant Ig class) to 2.5 kb for S_{γ_3} and to only 1 kb for S_δ . Studies pointed the S region size as an important factor in determining endogenous cCSR efficiency because cCSR frequencies correlated with S region length (Zarrin et al., 2005). The very low level of $\mu\delta$ CSR in wt mice may be linked to the short length (0.5 kb) of the σ_δ region and to a less active targeting by AID than S_{γ_1} and S_{γ_3} during cCSR.

An intronic (I) exon is positioned upstream of each C_H gene except C_δ both in mice and humans. I_H - C_H germinal transcripts render S_H regions substrate for DNA modifications by the CSR machinery, including AID. As previously identified in humans (Chen et al., 2009), an I_μ - C_δ transcript is identified in mice. This I_μ - C_δ transcript is of importance to render both S_μ and σ_δ regions substrate for DNA modifications, especially because no I_δ exon is documented in the mouse and the human IgH locus. In contrast to mice and humans, an I_δ exon has been recently reported in the bovine IgH locus (Xu et al., 2012). This I_δ exon derives from the recent duplication of an I_μ - C_μ 1 genomic fragment (Zhao et al., 2002). Of interest, the bovine δ gene can be expressed by

CSR; analysis of S_{μ} - S_{δ} junctions demonstrated, as in mice, a preference for using the microhomology-based end-joining pathway (Xu et al., 2012). After $\mu\delta$ CSR, I_{μ} - C_{δ} transcripts are still detected and are the reflection of the post-IgD CSR transcription and not simply a germinal transcript of importance to render both S_{μ} and σ_{δ} regions substrate to CSR-induced DNA modifications.

The 3'RR is mandatory for cCSR toward IgG, IgA, and IgE isotypes (Vincent-Fabert et al., 2010b). This is obviously not the case for IgD. Patients with hyper-IgM syndromes have higher $\mu\delta$ CSR that may stand as a compensatory response due to the absence of other switched isotypes (Chen and Cerutti, 2010). It appears that deletion of the 3'RR, most probably through a compensatory response due to the absence of other switched isotypes, enhances IgD CSR without widely impacting the patterns of S_{μ} - σ_{δ} junctions. Thus, AID-induced $\mu\delta$ CSR occurs independently of the IgH 3'RR, a result that markedly contrasts with S_{μ} - S_{γ} , S_{μ} - S_{ϵ} , and S_{μ} - S_{α} cCSR. The lower AID-induced mutations both in S_{μ} and σ_{δ} region during $\mu\delta$ CSR (as compared with those in S_{μ} , $S_{\gamma 1}$, and $S_{\gamma 3}$ during S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ and S_{μ} - $S_{\gamma 3}$ cCSR) suggest that AID might be recruited to the IgH locus by different means than cCSR. This result partially fits with recent data showing, in addition to cCSR, that the 3'RR is also a key element for AID recruitment during AID-induced SHM both in VDJ-expressed sequences and S_{μ} (Rouaud et al., 2013). The analysis of SHM in VDJ expressed sequences of 3'RR-deficient B cells that have undergone $\mu\delta$ CSR confirms that the 3'RR is essential to the SHM process on V(D)J exons and that a physiological dissociation exists between SHM and CSR in primary B cells of 3'RR-deficient mice as in T cell-independent responses (Phan et al., 2005).

CSR to IgD is obviously a rare event and we now show that it occurs independently of the IgH 3'RR. It might be of interest to notice that in this special case, and in contrast to SHM of VDJ and of S_{μ} regions during cCSR, the rate of mutations affecting the target regions of $\mu\delta$ CSR is not affected by the 3'RR deletion. This observation, together with the unique location of IgD switching only in the mucosa-associated lymphoid tissue, argues for a specific regulation of this event, allowing AID recruitment to the IgH locus in a 3'RR-independent manner and in response to stimuli that remains to be determined. Transcription being required for AID targeting, the simultaneous accessibility of S_{μ} and σ_{δ} to AID likely needs constitutive I_{μ} - C_{δ} transcription (encompassing both S_{μ} to σ_{δ}). However, because I_{μ} - C_{δ} transcription is common in all naive B cells and during their initial entry into GC, it is obviously not sufficient by itself for inducing accessibility to $\mu\delta$ CSR and another stimulus uniquely occurring into mouse MLNs and into human tonsils likely allows the 3'RR-independent recruitment of AID on the IgH locus in some B cells. Until now, our knowledge concerning $\mu\delta$ CSR in mice only derived from studies of myeloma and hybridoma cell lines (Owens et al., 1991; Preud'homme et al., 2000). 3'RR-deficient mice give us the first opportunity to investigate it in primary B cells.

Location of IgD⁺IgM⁻ cells in the marginal zone, but not in the follicular zone, together with their PNA⁻GL7⁻ status

and their lack of SHM in the VDJ segment might be suggestive of T cell-independent non-GC origin for cells with $\mu\delta$ CSR, as previously documented in physiology for some mucosa-associated lymphoid tissue B cells undergoing T cell-independent IgA CSR (Bergqvist et al., 2010). In addition, cCSR in the absence of SHM was reported in some cases of chronic lymphocytic leukemia B cells (Oppezio et al., 2003) upon N-terminal mutation of AID (Shinkura et al., 2004) and, recently, in *Ung*^{-/-} mice during an acute antigenic challenge (Zahn et al., 2013). Our data with $\mu\delta$ CSR further indicates that AID can be recruited to the IgH locus under various different forms, eventually associated with some different partners to mediate either cCSR and VDJ SHM (both processes requiring the 3'RR), or in the present case $\mu\delta$ CSR (where the 3'RR is at least superfluous; Ronai et al., 2007). According to the concept that such IgD-only cells may locally participate in immune surveillance against pathogens present at mucosal sites, their increase in 3'RR-deficient mice with an IgA production defect might be a compensatory mechanism as previously suggested in IgA-deficient patients (Brandtzaeg and Johansen, 2005).

IgD⁺IgM⁻ B cells in mice exhibited numerous similarities with human ones. Consistent with published human data (Chen et al., 2009), they were CD138⁻, expressed the activation-induced (or B1 compartment-related) molecule CD5, and down-regulated several B cell-specific markers usually down-regulated by differentiated plasma cells. Whether human IgD⁺IgM⁻ cells show a strong bias toward the preferential expression of the λ -light chains (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009), it is not the case in mice, a result which might be linked to the κ^+/λ^+ ratio, globally reported in mouse B cells around 95/5 (Arakawa et al., 1996). Whether human IgD⁺IgM⁻ cells are reported to have undergone extensive SHM and display clonal relatedness (Arpin et al., 1998), mice IgD⁺IgM⁻ cells are unmutated in their VDJ regions with no evident sign of clonality. These latter results are in accordance with their localization in the marginal zone of GC, a region with cells not submitted to an intensive SHM process or exhibiting a high rate of proliferation (mice IgD⁺IgM⁻ cells had a low Ki67 index).

In conclusion, IgD CSR occurs in B cells of MLNs of *wt* mice. There is extensive somatic mutation of the IgHV region in human IgD⁺ cells (Arpin et al., 1998) but not in mouse. The effects of physiological location of switching cells might explain this difference as well as the structural differences in mouse and human 3'RR. The molecular features of S_{μ} - σ_{δ} junctions suggest a predominant involvement of the A-EJ pathway in this process. In contrast to IgG, IgA, and IgE classes, IgD CSR occurs independently of the IgH 3'RR and now stands as an amazing exception contrasting with all the other AID-dependent modifications of the IgH locus previously shown to formally involve the 3'RR in mouse B cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Generation of 3'RR-deficient mice has been previously reported (Vincent-Fabert et al., 2010b). *wt* mice and 3'RR-deficient mice were 8–12 wk old except when specified. Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Mice immunizations were done orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 d.

Cell cytometry analysis. Single-cell suspensions from MLNs were fixed and permeabilized with the Intraprep permeabilization reagent (Beckman Coulter) before incubation with FITC-labeled IgD (SouthernBiotech) or irrelevant antibody and analyzed on a Fortessa LSR2 (BD; Truffinet et al., 2007; Vincent-Fabert et al., 2009). Phenotyping of IgD^+IgM^- cells were made with the following antibodies: v450-IgD, APC-IgM, FITC-B220, FITC-CD5, PE-CD11b, PE-CD19, PE-CD21, PC7-CD23, PE-CD138, PE-GL7 and FITC-PNA, and PE-Fas and FITC-Ki67.

Dot plot analysis. Dot plot analysis of the mouse DNA fragment encompassing the 5' E μ intronic enhancer and the C δ exon 2 was done with the Nucleic Acid Dot Plot Program. Window size and mismatch limit were set to 23 and 3, respectively.

Amplification, cloning, and sequencing of $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ junctions. $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ junctions were studied using a touchdown PCR, followed by a nested PCR on fresh MLN cells using the following parameters. Touchdown PCR: primer 1, 5'-CAGTTGAGGCCAGCAGGT-3' and primer 2, 5'-CCAATTACTAACAGCCCAGGT-3' (1 cycle, 98°C for 3 min; 3 cycles, 98°C for 30 s, 64°C for 40 s, and 72°C for 90 s; 3 cycles, 98°C for 30 s, 62°C for 40 s, and 72°C for 90 s; 25 cycles, 98°C for 30 s, 60°C for 40 s, and 72°C for 90 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). Nested PCR: primer 3, 5'-CAGGTCGGCTG-GACTAACTC-3' and primer 4, 5'-CAGCCCAGGTTTATCTTTTCA-3' (1 cycle, 98°C for 3 min; 35 cycles, 98°C for 30 s, 65°C for 40 s, and 72°C for 90 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). The PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer; Fiancette et al., 2011). To demonstrate a specific association of σ_{δ} with $\mu\delta\text{CSR}$, nested PCR analysis was carry out with sense 1 and sense 3 primers and other reverse PCR primers corresponding to C μ (primer 18, 5'-GTGGGACGAACACATTACAT-TTGG-3' and primer 19, 5'-GTTTCATCTCTGCGACAGCTG-3') and a region between C δ and I γ 3 (primer 20, 5'-GCTCATAGCCTCCTTAGGT-TCC-3' and primer 21, 5'-GAGACTGTTCACTCTATCTTTACCAC-3').

Amplification, Southern blotting, and sequencing of $\mu\delta\text{CSR}$ circles. $\mu\delta\text{CSR}$ circles were amplified by PCR using the following parameters: primer 6, 5'-GGACTCGTCACCAAATTCCA-3' (located at the beginning of σ_{δ}) and primer 7, 5'-GAAGACATTTGGGAAGGACTGACT-3' (located in C μ exon 1; 1 cycle, 95°C for 2 min; 40 cycles, 95°C for 15 s, 55°C for 20 s, and 72°C for 180 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). Hybridization of $\mu\delta\text{CSR}$ circles was performed with a 240 bp probe (probe B) located in the C μ exon1 (Péron et al., 2012). The C μ exon1 probe was cloned as a PCR fragment according to the following parameters: primer 8, 5'-CGTTCGAAGAAGGCTTC-CAAAGTC-3' and primer 9, 5'-TTATCGATGAGGACCAGAGAGGG-3' (1 cycle, 94°C for 3 min; 30 cycles, 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). The circle PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen) and sequenced with and ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer; Fiancette et al., 2011).

Southern blotting of $C_{\mu}-C_{\delta}$ junctions. $C_{\mu}-C_{\delta}$ junctions were studied after hybridization with a ^{32}P -labeled probe (460 bp length, probe A). This C δ probe was cloned as a PCR fragment located in-between primer 5 (5'-CCC-AGAACCCTGAGAAGGAAG-3'), located in the intron 5' of C δ and primer 4 (5'-CAGCCCAGGTTTATCTTTTCA-3'), located in C δ exon 1 (1 cycle, 94°C for 3 min; 30 cycles, 93°C for 45 s, 52°C for 45 s, and 72°C for 30 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min).

DNA extraction and amplification for SHM experiments. Genomic DNA was extracted from sorted B220 $^+$ IgD $^+$ IgM $^-$ cells (85% of purity). IgH VDJ-rearranged fragments were amplified by PCR using the following primers and multistep programs as previously reported (Rouaud et al., 2013): primer 10, 5'-GCGAAGCTTARGCCTGGGRCCTTCACTGAAG-3' complementary to the VHJ558 segment and primer 11, 5'-AGGCTCT-GAGATCCCTAGACAG-3' corresponding to a sequence 517 bp downstream

of the J H_4 segment using 1 cycle (98°C for 30 s), 33 cycles (98°C for 10 s, 67°C for 30 s, and 72°C for 90 s), and 1 cycle (72°C for 10 min). Igk light chain VJ-rearranged fragments were amplified by PCR as previously reported (Rouaud et al., 2013) using the following primers and multistep programs: primer 12, 5'-GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGRAC-3' (consensus for V κ) and primer 13, 5'-AGCGAATTCACCTTAGGAGA-CAAAAGAGAGAAC-3' (found 557 bp downstream of the J κ_5 segment) using 1 cycle at 98°C for 30s, 33 cycles (98°C for 10 s, 66°C for 30 s and 72°C for 90 s), and 1 cycle at 72°C for 10 min. PCR products were cloned and sequenced as described (Fiancette et al., 2011).

Immunohistochemistry. Frozen 8- μm sections were thawed at room temperature and dried before being hydrated in PBS. Slides were fixed with cold acetone for 20 min at -20°C , dried for 10 min, and incubated with PBS BSA 3% for 45 min. Rat anti-mouse APC-CD45R (BD; clone RA3-6B2, 560472), rat anti-mouse Alexa Fluor 488-IgD (BioLegend; clone 11-26c-2a, 405718), and rat anti-mouse PE-IgM (eBioscience; clone II/41, 17-5790-82) were used at 1:50 for 1 h at 37°C in PBS BSA 0.3%. Goat anti-mouse κ (Beckman Coulter; 731871) or anti-mouse λ (SouthernBiotech; 1060-01) was used at 1:100 and revealed with a DyLight 594 rabbit anti-goat IgG (Thermo Fisher Scientific; 072-09-13-06) used at 1:250. Slides were mounted with moviol medium.

Real-time PCR analysis of membrane C μ and I μ -C δ transcripts. Total RNA was prepared from freshly isolated IgD $^+$ IgM $^-$ and IgD $^+$ IgM $^+$ MLN B cell. Reverse transcription was performed with 500 ng of total RNA. RT-PCR experiments were done with SuperScript III reverse transcription (Invitrogen). Real-time PCR analysis (on an ABI Prism 7000 system; Applied Biosystems) was made with the Syber Green method using 10 ng cDNA using the following primer: I μ primer 14, 5'-CTCTGGCCTGCTTATTGTTG-3' and C δ primer 15, 5'-GCTCCCAGCTGATTTTCAGT-3'; μ membrane primer 16 (in exon μ 4), 5'-TGGAAGTCCGGAGAGACCTA-3' and μ membrane primer 17 (in exon μ membrane 1), 5'-TTCCTCCTCAGCATTCACCT-3'. GAPDH was used for normalization of gene expression levels (TaqMan reference Mm99999915-g1).

Spleen cell cultures for CSR. Single-cell suspensions of spleen cells were cultured 3 d at 10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS, with or without addition of 20 ng/ml IL-4 (PeproTech). 3-d in vitro-stimulated splenocytes were harvested and DNA was extracted for investigation of $S_{\mu}-S_{\gamma 1}$ and $S_{\mu}-S_{\gamma 3}$ junctions (Vincent-Fabert et al., 2009).

LM-PCR. Genomic DNA from *wt* mice, 3'RR-deficient mice, and AID-deficient mice was extracted and purified using Phase Lock gel. 10 μg was treated with T4 DNA polymerase (New England Biolabs, Inc.), which trims back 3' overhangs while filling in 3'-recessed ends, thereby yielding blunt 5'-phosphorylated DNA ends. 1 μg DNA was then ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs, Inc.) in a 20- μl reaction volume with the double-strand anchor linker BW (Zan and Casali, 2008). DSBs were detected by semi-nested LM-PCR using BW1 primer targeting the BW linker sequence (5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3') and primer 2, specific to σ_{δ} (5'-CCAATTACTAAACAGCCCAGGT-3'), using the following parameters: (1 cycle, 94°C for 30 s; 25 cycles, 94°C for 10 s, 55°C for 20 s, and 65°C for 2 min; and 1 cycle, 65°C for 7 min). DSBs were studied after hybridization with the same ^{32}P -labeled probe as for Southern blotting of C μ -C δ junctions.

Clonality assay. Genomic DNA prepared from IgD $^+$ IgM $^-$ cells of 3'RR-deficient mice was digested with EcoRI and analyzed by Southern blot with a ^{32}P -labeled J H probe (Truffinet et al., 2007).

Online supplemental material. Table S1 shows $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$, $S_{\mu}-S_{\gamma 1}$, and $S_{\mu}-S_{\gamma 3}$ junctions.

This paper is dedicated to Michael S. Neuberger in memoriam.

We thank S. Desforages and B. Remerand for help with animal care.

P. Rouaud was supported by a grant from ARC. This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220100601332) and ANR (Projets Blanc 2011).

The authors declare no competing financial interests.

Contributions: P. Rouaud, A. Saintamand, S. Lecardeur, F. Saad, C. Carrion, M. Cogné, and Y. Denizot actively participated to the experimental design of the study. M. Cogné and Y. Denizot participated in the scientific discussion for manuscript writing, and obtained financial grants and agreement of the ethics committee of our institution to perform the study.

Submitted: 2 July 2013

Accepted: 1 April 2014

REFERENCES

- Arakawa, H., T. Shimizu, and S. Takeda. 1996. Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the κ and λ loci. *Int. Immunol.* 8:91–99. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/8.1.91>
- Arpin, C., O. de Bouteiller, D. Razanajaona, I. Fugier-Vivier, F. Brière, J. Bancheau, S. Lebecque, and Y.J. Liu. 1998. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, C μ –C δ switch, and λ light chain expression. *J. Exp. Med.* 187:1169–1178. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.187.8.1169>
- Bébin, A.G., C. Carrion, M. Marquet, N. Cogné, S. Lecardeur, M. Cogné, and E. Pinaud. 2010. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* 184:3710–3717. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901978>
- Bergqvist, P., A. Stenstrom, N.Y. Lycke, and M. Bemark. 2010. T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J. Immunol.* 184:3545–3553. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901895>
- Boboila, C., F.W. Alt, and B. Schwer. 2012. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* 116:1–49. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00001-6>
- Brandtzaeg, P., and E.E. Johansen. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206:32–63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x>
- Chan, T.D., and R. Brink. 2012. Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol. Rev.* 247:11–23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01118.x>
- Chen, K., and A. Cerutti. 2010. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol. Rev.* 237:160–179. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x>
- Chen, K., W. Xu, M. Wilson, B. He, N.W. Miller, E. Bengtén, E.S. Edholm, P.A. Santini, P. Rath, A. Chiu, et al. 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10:889–898. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1748>
- Cogné, M., R. Lansford, A. Bottaro, J. Zhang, J. Gorman, F. Young, H.L. Cheng, and F.W. Alt. 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77:737–747. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90057-4)
- Durandy, A. 2003. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur. J. Immunol.* 33:2069–2073. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200324133>
- Fiancette, R., P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, B. Laffleur, V. Magnone, M. Cogné, and Y. Denizot. 2011. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J. Immunol.* 187:5772–5782. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102059>
- Hackney, J.A., S. Misaghi, K. Senger, G. Garriss, Y. Sun, M.N. Lorenzo, and A.A. Zarrin. 2009. DNA targets of AID: evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* 101:163–189. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01005-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01005-5)
- Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, et al. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168:57–64.
- Henderson, A., and K. Calame. 1998. Transcriptional regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 16:163–200. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.163>
- Johansen, E.E., E.S. Baekkevold, H.S. Carlsen, I.N. Farstad, D. Soler, and P. Brandtzaeg. 2005. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood* 106:593–600. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-12-4630>
- Manis, J.P., N. van der Stoep, M. Tian, R. Ferrini, L. Davidson, A. Bottaro, and F.W. Alt. 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188:1421–1431. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.8.1421>
- Moore, K.W., J. Rogers, T. Hunkapiller, P. Early, C. Nottenburg, I. Weissman, H. Bazin, R. Wall, and L.E. Hood. 1981. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1800–1804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.78.3.1800>
- Ohta, Y., and M. Flajnik. 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10723–10728. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601407103>
- Oppezzo, P., F. Vuillier, Y. Vasconcelos, G. Dumas, C. Magnac, B. Payelle-Brogard, O. Pritsch, and G. Dighiero. 2003. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 101:4029–4032. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-10-3175>
- Oretti, C., E. Barbi, F. Marchetti, L. Lepore, A. Ventura, A. D'Osualdo, M. Gattorno, S. Martellosi, and A. Tommasini. 2006. Diagnostic challenge of hyper-IgD syndrome in four children with inflammatory gastrointestinal complaints. *Scand. J. Gastroenterol.* 41:430–436. <http://dx.doi.org/10.1080/00365520500327743>
- Owens, J.D. Jr., E.D. Finkelman, J.D. Mountz, and J.F. Mushinski. 1991. Nonhomologous recombination at sites within the mouse JH-C δ locus accompanies C μ deletion and switch to immunoglobulin D secretion. *Mol. Cell. Biol.* 11:5660–5670.
- Pavri, R., and M.C. Nussenzweig. 2011. AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110:1–26. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3>
- Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336:931–934. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218692>
- Phan, T.G., S. Gardam, A. Basten, and R. Brink. 2005. Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen. *J. Immunol.* 174:4567–4578.
- Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogné. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15:187–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00181-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00181-9)
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
- Preud'homme, J.L., I. Petit, A. Barra, F. Morel, J.C. Lecron, and E. Lelièvre. 2000. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol. Immunol.* 37:871–887. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00006-2)
- Rauta, P.R., B. Nayak, and S. Das. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148:23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Ronai, D., M.D. Iglesias-Ussel, M. Fan, Z. Li, A. Martin, and M.D. Scharff. 2007. Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 204:181–190. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062032>
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2012. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287:8356–8360. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.341024>

- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
- Shinkura, R., S. Ito, N.A. Begum, H. Nagaoka, M. Muramatsu, K. Kinoshita, Y. Sakakibara, H. Hijikata, and T. Honjo. 2004. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5:707–712. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1086>
- Stavnezer, J., A. Björkman, L. Du, A. Cagigi, and Q. Pan-Hammarström. 2010. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* 108:45–109. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00003-3>
- Truffinet, V., E. Pinaud, N. Cogné, B. Petit, L. Guglielmi, M. Cogné, and Y. Denizot. 2007. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a pre-dominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* 179:6033–6042.
- Vincent-Fabert, C., V. Truffinet, R. Fiancette, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182:6926–6932. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900214>
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2010a. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40:3306–3311. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040778>
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010b. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 116:1895–1898. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
- Xu, B., J. Wang, M. Zhang, P. Wang, Z. Wei, Y. Sun, Q. Tao, L. Ren, X. Hu, Y. Guo, et al. 2012. Expression analysis of immunoglobulin D in cattle (*Bos taurus*), a large domesticated ungulate. *PLoS ONE*. 7:e44719. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044719>
- Yan, C.T., C. Boboila, E.K. Souza, S. Franco, T.R. Hickernell, M. Murphy, S. Gumaste, M. Geyer, A.A. Zarrin, J.P. Manis, et al. 2007. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*. 449:478–482. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06020>
- Zahn, A., M. Daugan, S. Safavi, D. Godin, C. Cheong, A. Lamarre, and J.M. Di Noia. 2013. Separation of function between isotype switching and affinity maturation in vivo during acute immune responses and circulating auto-antibodies in UNG-deficient mice. *J. Immunol.* 190:5949–5960. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202711>
- Zan, H., and P. Casali. 2008. AID- and Ung-dependent generation of staggered double-strand DNA breaks in immunoglobulin class switch DNA recombination: a post-cleavage role for AID. *Mol. Immunol.* 46:45–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.003>
- Zarrin, A.A., M. Tian, J. Wang, T. Borjeson, and F.W. Alt. 2005. Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:2466–2470. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409847102>
- Zhao, Y., I. Kacskovics, Q. Pan, D.A. Liberles, J. Geli, S.K. Davis, H. Rabbani, and L. Hammarstrom. 2002. Artiodactyl IgD: the missing link. *J. Immunol.* 169:4408–4416.

Article 3

Elucidation of *IgH* 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Faten Saad, Géraldine Rios, Michel Cogné & Yves Denizot

Nature Communications, 2015, Volume 6, Article numéro 7084.

L'importance de la 3'RR lors de la CSR a été démontrée en 2010, dans le premier article issu de l'analyse des souris 3'RR KO (Vincent-Fabert et al., 2010a). Nous avons souhaité comprendre comment cette région régule ce processus d'un point de vue mécanistique. Pour ce faire, nous avons mis à profit l'existence d'un *switch* résiduel vers IgG1 pour analyser les effets de la délétion de la 3'RR lors de la réponse à une stimulation induisant le switch. La CSR est considérée comme un processus en deux étapes distinctes : la cassure et la réparation. Nous avons notamment voulu déterminer au cours de quelle étape intervient la 3'RR.

Nous avons stimulé des splénocytes *in vitro* pendant 3 jours avec un cocktail LPS+IL4 pour induire la CSR vers IgG1. L'analyse par cytométrie en flux a confirmé la baisse de la CSR (1,6% de cellules IgG1⁺ dans les souris 3'RR KO vs 20,2% chez les *Wt*). Pour éliminer l'hypothèse que cette baisse soit due à un défaut de réparation provoquant un blocage de la CSR, nous avons analysé la fréquence de délétion intra-S μ en amplifiant puis hybridant l'intégralité de la région S μ . Nous avons détecté dans les souris *Wt* comme dans les 3'RR KO la présence de plusieurs bandes de tailles différentes, confirmant la présence de cellules ayant subi une ou plusieurs délétions intra-S μ .

Nous avons amplifié, cloné puis séquencé des jonctions S μ -S γ 1 à partir de l'ADN des splénocytes stimulés. L'analyse du type de jonction n'a révélé aucune différence entre les souris *Wt* et 3'RR, suggérant que la délétion de la 3'RR ne perturbe pas le choix de la voie de réparation utilisée. Nous avons cependant observé une baisse de la fréquence de mutation de part et d'autre de la jonction chez les souris déficientes pour la 3'RR, suggérant une baisse du ciblage d'AID. Cette diminution a été confirmée par des expériences de ChIP AID, et est plus

marquée sur $S\gamma 1$ que sur $S\mu$. De plus, des expériences de LM-PCR ont montré une diminution du nombre de DSB chez les animaux 3'RR KO, notamment dans $S\gamma 1$. Ces données indiquent donc que la 3'RR perturbe la CSR en limitant le recrutement d'AID lors de la phase initiale.

Le recrutement efficace d'AID requiert l'accessibilité des régions *switchs*, permise par leur transcription et leur enrichissement en variants d'histones associés à un état décondensé de la chromatine. Nous avons donc mesuré la transcription germinale dans les régions μ et $\gamma 1$ par Q-PCR puis par ChIP RNA pol II, ainsi que la présence de marques épigénétiques associées à la CSR dans les régions *switchs* (H3ac, H4ac, H3K4me3, H3K9ac). La transcription germinale est diminuée d'environ 50% dans $S\mu$ et 80% dans $S\gamma 1$ dans les souris 3'RR KO. Ces résultats ont été confirmés par les expériences de ChIP RNA pol II p-ser2 (en élongation), qui donnent un profil similaire. De manière intéressante la RNA pol II p-ser5 (en pause), indispensable au recrutement d'AID, ne semble pas diminuée sur $S\mu$ mais l'est fortement sur $S\gamma 1$. Les analyses de marques épigénétiques par ChIP n'ont montré aucune différence significative sur $S\mu$ entre les souris *Wt* et 3'RR KO. Inversement, sur $S\gamma 1$ on observe une diminution significative pour H3ac, H3K4me3 et H3K9ac. Des expériences de ChIP supplémentaires (H3K4me3, H3K9ac, RNA pol II et AID) ont montré une diminution encore plus importante sur les régions $S\gamma 3$, $S\gamma 2b$ et $S\epsilon$ après stimulation appropriée, en accord avec la quasi disparition de la CSR vers ces isotypes chez les souris 3'RR KO.

AID ne peut agir que sur l'ADN simple brin, qui est présent sous forme de R-loops dans les régions *switchs*. Nous avons détecté les R-loops par conversion au bisulfite et séquençage, selon la technique mise au point par l'équipe de Lieber (Roy et al., 2008). Les résultats montrent une diminution du nombre et de la longueur des R-loops dans $S\gamma 1$ chez les souris 3'RR KO. Inversement, elles ne sont pas affectées dans $S\mu$.

Toutes ces données suggèrent que la 3'RR contrôle l'accessibilité des régions *switchs* acceptrices à AID lors de l'étape initiale de CSR, mais ne semble nécessaire ni pour l'accessibilité de $S\mu$, ni pour l'étape finale de réparation.

Pour analyser les effets de ce blocage de la CSR, nous avons étudié le transcriptome des cellules stimulées *in vitro*. Parmi les gènes dérégulés dans les animaux 3'RR déficients, on remarque des gènes impliqués dans les modifications d'histones (deméthylases, acétyltransférase...) et dans les voies de réparations de l'ADN. Ces altérations du transcriptome ne sont pas retrouvées dans le modèle AID^{-/-} chez qui la CSR est également

abolie, mais par un mécanisme différent : chez ces animaux le défaut est dû à une absence de DSB. Le profil particulier obtenu dans les souris 3'RR KO n'est donc pas dû à la seule absence de CSR, mais plutôt au maintien des cellules dans un état « d'attente » de la CSR : des DSB sont induites dans S μ mais ne peuvent pas être réparées par recombinaison longue distance en absence de cassures dans les régions acceptrices. Pour confirmer ces données, nous avons comparé l'expression d'un panel de 84 miRNA dans des souris *Wt*, 3'RR KO et *AID*^{-/-}. Nous avons identifié 11 miRNA surexprimés dans les souris 3'RR KO, mais pas dans les *AID*^{-/-}. Parmi les cibles de ces miRNA, on retrouve des gènes impliqués dans la modification des histones ou dans les voies de réparation de l'ADN, notamment par recombinaison homologue (HR) ou l'AEJ.

Ces données montrent que lors de l'induction de la CSR et des cassures doubles brins, les lymphocytes B mobilisent un ensemble de voies pour favoriser ce processus et limiter au maximum les risques de translocations. Cela passe par la régulation de l'accessibilité des régions *switchs* (via la transcription germinale, les modifications épigénétiques et l'expression d'enzymes modifiant les histones), ainsi que par l'activation des voies de réparation de l'ADN. On remarque notamment que la voie du NHEJ semble favorisée au détriment de la voie de HR ou de l'AEJ. Cette dernière étant connue pour induire fréquemment des translocations oncogéniques au locus IgH, il pourrait s'agir d'un mécanisme de protection mis en place par la cellule lors de la CSR, ce qui expliquerait la prédominance du NHEJ lors de ce processus. De même, on n'observe pas d'accumulation de DSB par LM-PCR dans S μ malgré l'absence de région acceptrice pour compléter la CSR. L'hypothèse la plus vraisemblable est que ces cassures soient réparées par jonction intra-*switch*. Ces jonctions serviraient alors de mécanisme de secours en cas de CSR incomplète, afin de limiter le temps pendant lequel les DSB sont exposées en attente de "partenaire" pour finaliser la CSR.

En résumé, notre étude a permis de démontrer que :

- La 3'RR agit sur l'étape initiale de la CSR mais pas sur la phase de réparation. Sa délétion entraîne une baisse du recrutement d'AID et de la fréquence de DSB.
- Elle permet l'accessibilité de la région *switch* acceptrice en augmentant la transcription germinale et les modifications épigénétiques associées à la CSR.
- L'accessibilité de S μ est moins affectée par l'absence de 3'RR que celle de la région acceptrice.

- Les délétions intra-switch se déroulent normalement dans les souris 3'RR KO. Elles semblent agir comme un mécanisme de secours en cas de CSR incomplète
- Lors de la CSR, les lymphocytes B modifient transitoirement leurs transcriptomes pour favoriser ce processus, notamment en favorisant la réparation des DSB.

ARTICLE

Received 9 Jan 2015 | Accepted 1 Apr 2015 | Published 11 May 2015

DOI: 10.1038/ncomms8084

Elucidation of *IgH* 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion

Alexis Saintamand^{1,2}, Pauline Rouaud^{1,2}, Faten Saad^{1,2}, Géraldine Rios³, Michel Cogné^{1,2,4} & Yves Denizot^{1,2}

In mature B cells, class switch recombination (CSR) replaces the expressed constant C_{μ} gene with a downstream C_H gene. How the four transcriptional enhancers of the *IgH* 3' regulatory region (3'RR) control CSR remains an open question. We have investigated IgG₁ CSR in 3'RR-deficient mice. Here we show that the 3'RR enhancers target the $S_{\gamma 1}$ acceptor region (and poorly the S_{μ} donor region) by acting on epigenetic marks, germline transcription, paused RNA Pol II recruitment, R loop formation, AID targeting and double-strand break generation. In contrast, location and diversity of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions are not affected by deletion of the 3'RR enhancers. Thus, the 3'RR controls the first steps of CSR by priming the S acceptor region but is not implicated in the choice of the end-joining pathway.

¹Université de Limoges, CRIBL, UMR 7276, Limoges 87000, France. ²CNRS UMR 7276, Limoges 87000, France. ³CNRS et Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097, Sophia Antipolis 06560, France. ⁴Institut Universitaire de France, Paris 87025, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.D. (email: yves.denizot@unilim.fr).

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA remodelling events^{1,2}. Multiple *cis*-regulatory elements located 5' and 3' of constant (C) genes control B-cell ontogeny (schematised in the Supplementary Fig. 1a). Among 5' elements, the intronic E_{μ} enhancer is reported as a master control element of *V(D)J* recombination^{3,4}. The *IgH* 3' regulatory region (3'RR), that encompasses the four transcriptional enhancers *hs3a*, *hs1,2*, *hs3b* and *hs4*, controls μ transcription in mature B-cells⁵, and is the master element controlling conventional class switch recombination (CSR)^{6,7} and somatic hypermutation (SHM)⁸ but without role on *V(D)J* recombination^{9,10}. CSR is a *cis*-deletion or *trans*-recombination process that allows the C_{μ} gene to be replaced in mice with one of the downstream $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2b}$, $C_{\gamma 2a}$, C_{δ} or C_{α} gene. These C genes are preceded by repetitive target sequences for CSR termed switch (S) regions. CSR thus usually joins the most 5' S donor region (S_{μ}) and one of the downstream S acceptor regions ($S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 2b}$, $S_{\gamma 2a}$, S_{δ} or S_{α}) (schematised in the Supplementary Fig. 1a). CSR is a complex process involving epigenetic histone modifications for transcriptional accessibility, germline transcription, pausing of RNA Pol II, R loop formation, AID recruitment, AID-induced DNA double-strand breaks (DSBs) and their repair by means of end joining^{11–15}. CSR uses the classical non-homologous end joining (C-NHEJ) pathway that predominantly joins ends that lack homology (direct joints). However in C-NHEJ-deficient conditions, an alternative end-joining (A-EJ) pathway is left, which predominantly joins ends by using short homologies found in the proximity of broken ends (microhomology-based repair)^{11,13}. The 3'RR is crucial for conventional CSR^{6,7} but its mechanistic contribution remains enigmatic. The main conclusions drawn from knock-out mice are that the 3'RR plays a major role in promoting synapsis between S regions targeted by CSR¹⁶, and plays a partial role in promoting germline transcription of S regions initiating at I promoters^{6,17,18}. Whether the chromatin structure of S regions or the process of their repair after CSR are also dependent from the 3'RR is currently unknown. The IgG_1 class displays a special status with regard to 3'RR mutations, since it was the only Ig class whose expression was preserved after the first reported partial 3'RR alterations or truncations^{17,18}. Even after complete deletion of the 3'RR, while CSR to all other class-switched Ig was nearly abolished, residual low-level CSR to IgG_1 was maintained⁶. We thus now take advantage of this preserved IgG_1 switching in 3'RR-deficient mice to explore whether it reveals additional 3'RR-dependent mechanistic features during CSR. We report here that, even if some IgG_1 CSR still occurs, the 3'RR defect impacts the $S_{\gamma 1}$ acceptor region (rather than the donor S_{μ} region) in multiple aspects that precede CSR. This includes alterations of epigenetic marks, germline transcription, R loop formation, paused RNA Pol II, AID targeting, and generation of DSBs. In contrast, once DSBs are generated, their repair is completely normal in 3'RR-deficient animals. Altogether, this study precisely maps the activity of the 3'RR at the early phases of CSR, until the generation of DSBs, and shows that it has no contribution in the process of DNA repair between synapsed broken ends.

Results

Deletion of the 3'RR impairs C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR. The *IgH* $C_{\gamma 1}$ gene has long been claimed to carry some specific regulatory elements and notably an upstream $I_{\gamma 1}$ enhancer¹⁹. While the *IgH* 3'RR is the major *cis*-element promoting synapsis between S regions and recruiting AID to the *IgH* locus, several previous descriptions of 3'RR disruptions in the mouse indicated some persistence of CSR to $C_{\gamma 1}$ ^{6,16–18}, and we thus decided to analyse in details the

molecular features of this residual 3'RR-independent CSR. We confirmed that splenocytes from 3'RR-deficient mice showed a dramatically reduced ability to secrete IgG_1 *in vitro* in response to LPS + IL4 (Fig. 1a), which likely results from both decreased CSR in B-cells and the known defect of Ig secretion in plasma cells from such mice⁶. Parallel flow cytometry experiments evaluating membrane IgG_1 expression in B-cells confirmed that the deletion of the 3'RR did not abolish but reduced by >90% *in vitro* IgG_1 CSR (Fig. 1b). This strong but incomplete defect was also indicated by Southern blot experiments (full blots are included in the Supplementary Fig. 2) evaluating hybrid S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions in 3'RR-deficient mice (Fig. 1c). Junctions were first amplified using a touch-down PCR followed with a nested PCR and revealed after hybridization with a ³²P-labelled probe. DNA from AID-deficient B-cells (devoid of any CSR) was used as germline control DNA. The IgG_1 CSR defect was also evidenced by real-time-PCR evaluation of post-switch IgG_1 transcripts (Fig. 1d). Finally, serum IgG_1 levels paralleled results obtained after *in vitro* stimulation (Fig. 1e) and confirmed that, altogether, the deletion of the 3'RR strongly but only partially blocks IgG_1 CSR.

Intra S_{μ} deletion in 3'RR-deficient B cells. It could be argued that the few S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ joints found in 3'RR-deficient B-cells mask a defect in end-joining that would result in aborted CSR (and, therefore, no joint to analyse). To test this hypothesis we analysed intra S_{μ} deletions that frequently happen in mature B-cells during CSR²⁰. By using a PCR amplifying the whole S_{μ} region followed by Southern blotting, we checked that B-cell stimulation yielded fragments of different lengths corresponding to partial deletion of S_{μ} during CSR. A similar pattern was found for both *wt* mice and 3'RR-deficient mice (Fig. 2a), eliminating any global defect in end joining in 3'RR-deficient mice and also showing that S_{μ} is efficiently targeted by the CSR machinery in stimulated 3'RR-deficient B cells.

Analysis of S-junctions in residual C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR. To analyse S-junctions, the amplified PCR S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ fragments were cloned, sequenced and aligned with the germline S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ sequences (Fig. 2b and Supplementary Table 2). The deletion of the 3'RR had no effect on the structure of S junctions with regards to the relative amounts of direct joints, the frequency and length of microhomologies and the frequency of DNA insertion at the junction and of complex junctions. This suggests that beyond the AID targeting, DSBs and S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ synapsis steps, the late CSR resolution step is completely 3'RR-independent and remains unbiased in the choice between either the C-NHEJ or the A-EJ pathways for repairing broken DNA ends. We then analysed whether the absence of the 3'RR enhancers affected the position of the S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ breakpoints, which might indicate changes in the targeting or the synapsis of these regions. S_{μ} breakpoints appeared unaltered, with the vast majority of them located in the 5' part (0–600 bp) of S_{μ} (Fig. 3): 97% (33/34) and 91% (21/23) for *wt* and 3'RR-deficient mice, respectively (Fig. 2c). The 3'RR deletion by contrast affected the location of $S_{\gamma 1}$ breakpoints since 94% (32/34) of breaks cloned from *wt* cells were located in the 3' part (0–480 bp) of $S_{\gamma 1}$, while only 65% (15/23) were included in this segment in 3'RR-deficient cells. The pattern of AID targeting that initiates the formation of DSBs is thus 3'RR-independent within S_{μ} but partially 3'RR-dependent within $S_{\gamma 1}$. The increased representation of DNA breaks in the 3' part of $S_{\gamma 1}$ (>480 bp) was not linked to the presence of microhomologous sequences: 2/4 and 6/11 direct junctions for *wt* and 3'RR-deficient mice, respectively. We conclude that the recombination of S_{μ} with $S_{\gamma 1}$ in 3'RR-deficient B cells does not depend on the presence of microhomologous sequences and that the 3'RR is not involved in

the resolution of CSR nor in the choice between C-NHEJ and A-EJ pathways.

Influence of the 3'RR on AID recruitment during C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR.

Before the occurrence of DSBs, CSR is initiated by AID and the initial outcome of AID targeting can be the occurrence of base substitutions following cytidine deamination^{12,14,15,21}. To gain an insight into this initial targeting, we analysed mutations in S regions and observed that both the S_{μ} donor and $S_{\gamma 1}$ acceptor regions are less targeted by AID during IgG₁ CSR in 3'RR-deficient mice as compared with *wt* animals (Fig. 2d). This showed up with mutation rates falling at 55 and 30% of their *wt* levels for S_{μ} and $S_{\gamma 1}$, respectively. This observation suggests a lower recruitment of AID in S regions in 3'RR-deficient animals, which is indeed also indicated by ChIP experiments showing a significantly decreased AID loading at both the S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ regions (after 2 days LPS + IL4 *in vitro* stimulation) in 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Fig. 3a). A crucial step of CSR is the processing of AID lesions into DSBs, as a specific feature of S regions^{14,15}. Ligation-mediated PCR (LM-PCR, see Supplementary Fig. 1b) was used to highlight DSBs in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. Thus, extracted genomic DNA was treated with T4 DNA

polymerase yielding blunt DNA ends, then ligated with T4 DNA ligase with a double-strand anchor linker²². DSBs were detected by semi-nested PCR (primers targeting the linker sequence and a primer specific to S_{μ} or $S_{\gamma 1}$) followed by hybridization with a ³²P-labelled probe. LM-PCR highlighted a small reduction of DSBs in S_{μ} but a dramatic one in $S_{\gamma 1}$ in 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Fig. 3b; full blots are included in the Supplementary Fig. 2). Impaired induction of DNA lesions during CSR was suggested in patients to influence end joining²³. It is obviously not the case in 3'RR-deficient mice.

The substrate for AID is single-strand DNA (ssDNA) which is generated by germline transcription of S regions and Ig constant regions on both the transcribed and non-transcribed strands. Real-time PCR analysis only indicated a partial reduction of I_{μ} - C_{μ} and $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts in 3'RR-deficient mice (Fig. 3c), as previously suggested by semi-quantitative PCR⁶. This shows that the 3'RR does not promote CSR only by fostering germline transcription. Transcription through S regions generates R loops in which the RNA stably hybridizes to the template strands, displacing the non-template strand as ssDNA^{14,15}. For R loops experiments (see Supplementary Fig. 1c), extracted DNA was treated with bisulfite. Thus, only C located on ssDNA patches (that is, in R loops) could be converted in U. Bisulfite-treated DNA was

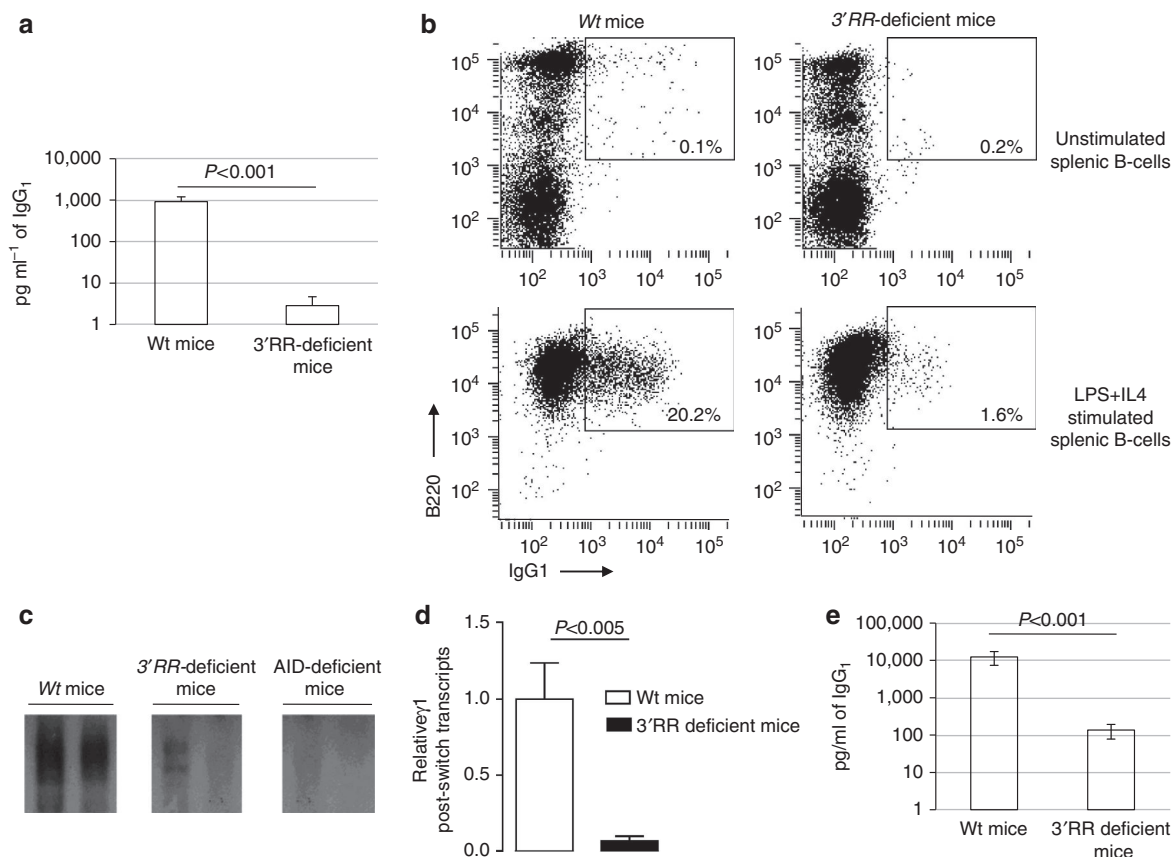


Figure 1 | Influence of the 3'RR deletion on IgG₁ CSR and secretion. (a) ELISA analysis of IgG₁ in supernatants of 3 days LPS + IL4 cultured B-cells. Data are the mean \pm s.e.m. of 8 experiments with 1 mouse (Mann-Whitney *U*-test for significance). (b) B splenocytes of *wt* and 3'RR-deficient mice were isolated (upper panel) and stimulated with LPS + IL-4 for 3 days (lower panel). Cells were labelled with anti-B220-APC antibodies and anti-IgG₁-FITC antibodies. Percentage of B220⁺ IgG₁⁺ cells is reported in the gate. One representative experiment out of four (one mouse per experiment) is shown. (c) Southern blot analysis of S_{μ} - $C_{\gamma 1}$ junctions amplified by PCR and hybridized with a 5' $C_{\gamma 1}$ probe from 3 days LPS + IL4 stimulated splenocytes from *wt*, 3'RR-deficient mice and AID-deficient mice. DNA from AID-deficient B-cells (devoid of any CSR) was used as germline control DNA. Fifty nanograms and 20 ng of DNA were used for PCR experiments, respectively. One representative experiment out of four (one mouse per experiment) is shown. (d) Real-time PCR analysis of post switched IgG₁ transcripts in 3 days LPS + IL4 cultured B cells. Values were normalized to *Gapdh* transcripts. Data are the mean \pm s.e.m. of 8 to 11 independent experiments with one mouse (Mann-Whitney *U*-test for significance). (e) ELISA analysis of IgG₁ in 12-week-old mice sera. Data are the mean \pm s.e.m. of 8 mice for each genotype (Mann-Whitney *U*-test for significance).

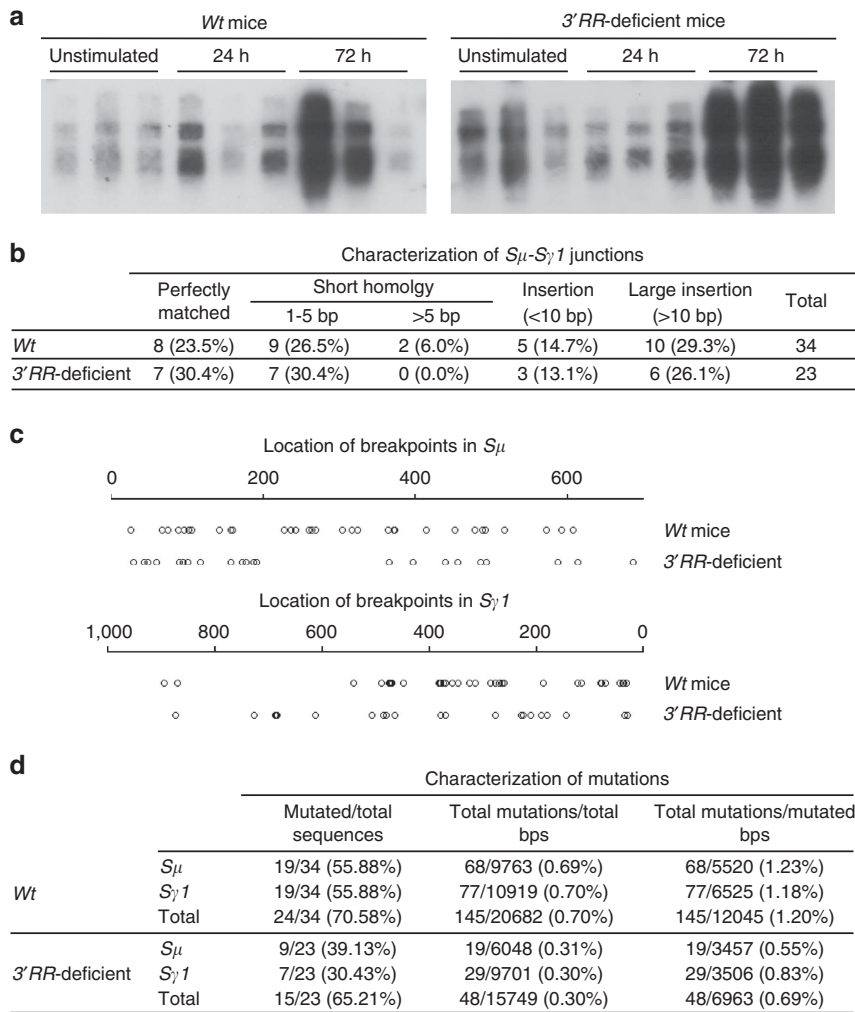


Figure 2 | Influence of the 3'RR deletion on diversity and mutations of *S*_μ-*S*_{γ1} junctions. (a) Intra *S*_μ deletion in 3'RR-deficient B cells. Splenocytes were LPS + IL4 stimulated for 24 or 72 h. PCR amplification of the whole *S*_μ region was followed by Southern blotting for detection of fragments of different length, more abundantly after B-cell stimulation, corresponding to partial deletion of *S*_μ during CSR. A similar pattern is found for wt and 3'RR-deficient mice. Results from three mice out of six for each genotype are reported. (b) B splenocytes were stimulated with LPS + IL-4 to generate *C*_μ-*C*_{γ1} CSR. *S*_μ-*S*_{γ1} junctions were cloned and sequenced. Percentage of junctions with insertion and junctional microhomology are indicated. Data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse per experiment for wt mice and 10 independent experiments with 1 mouse for 3'RR-deficient mice. All junctions are reported in the Supplementary Table 1. (c) Location of *S*_μ-*S*_{γ1} breaks during *in vitro* IgG1 CSR (6 wt mice and 10 3'RR-deficient mice; same junctions and mice as in (a)). (d) Number of mutations and mutation frequency in the donor region (*S*_μ) and the acceptor region (*S*_{γ1}) during *C*_μ-*C*_{γ1} CSR. 34 wt junctions (data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse per experiment) and 23 3'RR-deficient junctions (data are pooled from 10 independent experiments with 1 mouse per experiment; same junctions and mice as in (b,c)).

then amplified by PCR and sequenced to detect R loops in *S*_μ and *S*_{γ1} regions. As shown in Fig. 3d, the formation of R loops was markedly altered in *S*_{γ1} region but not in *S*_μ region of 3'RR-deficient mice (each long line represents an independent sequence and the small vertical bars on each line indicate a C on the sequence converted to a T, indicating that the sequence was in a single-strand conformation). R loops in the *S*_μ region appear to be even longer in 3'RR-deficient mice, a result that might be taken as an indication of the reduced CSR efficiency due to the reduced *S*_{γ1} CSR priming. AID was shown to be in a complex with RNA Pol II (Pol II P-ser2) and paused RNA Pol II (Pol II P-ser5)²⁴. ChIP experiments showed a weak decrease in the load of RNA Pol II (but not paused RNA Pol II) in the *I*_μ-*S*_μ-*C*_μ region (Fig. 4a,b). By contrast, 3'RR-deficient cells showed dramatically decreased binding of RNA Pol II and paused RNA Pol II throughout the *P*_{γ1}-*I*_{γ1}-*S*_{γ1}-*C*_{γ1} region (Fig. 4a,b). Collectively, our data indicated that the 3'RR is of key importance for the regulation, in *S*_{γ1}

region, of RNA Pol II recruitment, transcriptional activity and pausing, that is known prerequisites of AID recruitments. The lower accumulation of AID in the *S*_{γ1} region of 3'RR-deficient mice translates into lower amounts of DSBs and thus reduced efficiency of IgG1 CSR. Lower *S*_{γ1} RNA Pol II targeting and *I*_{γ1}-*C*_{γ1} germline transcription are also in agreement with reduced length of *S*_{γ1} R loops. Of interest, the *S*_μ donor region was markedly less affected by the 3'RR deletion than the *S*_{γ1} acceptor region, suggesting that *S*_μ is the less 3'RR-dependent *S* region of the IgH locus at both the level of transcription and AID targeting. Reduced *S*_μ-*S*_{γ1} CSR in 3'RR-deficient mice thus mostly involves decreased accessibility and less frequent DSBs in the acceptor *S*_{γ1} than in the donor *S*_μ region.

Chromatin remodelling in the absence of the IgH 3'RR. Histone H3 and H4 modifications (acetylation and methylation) are

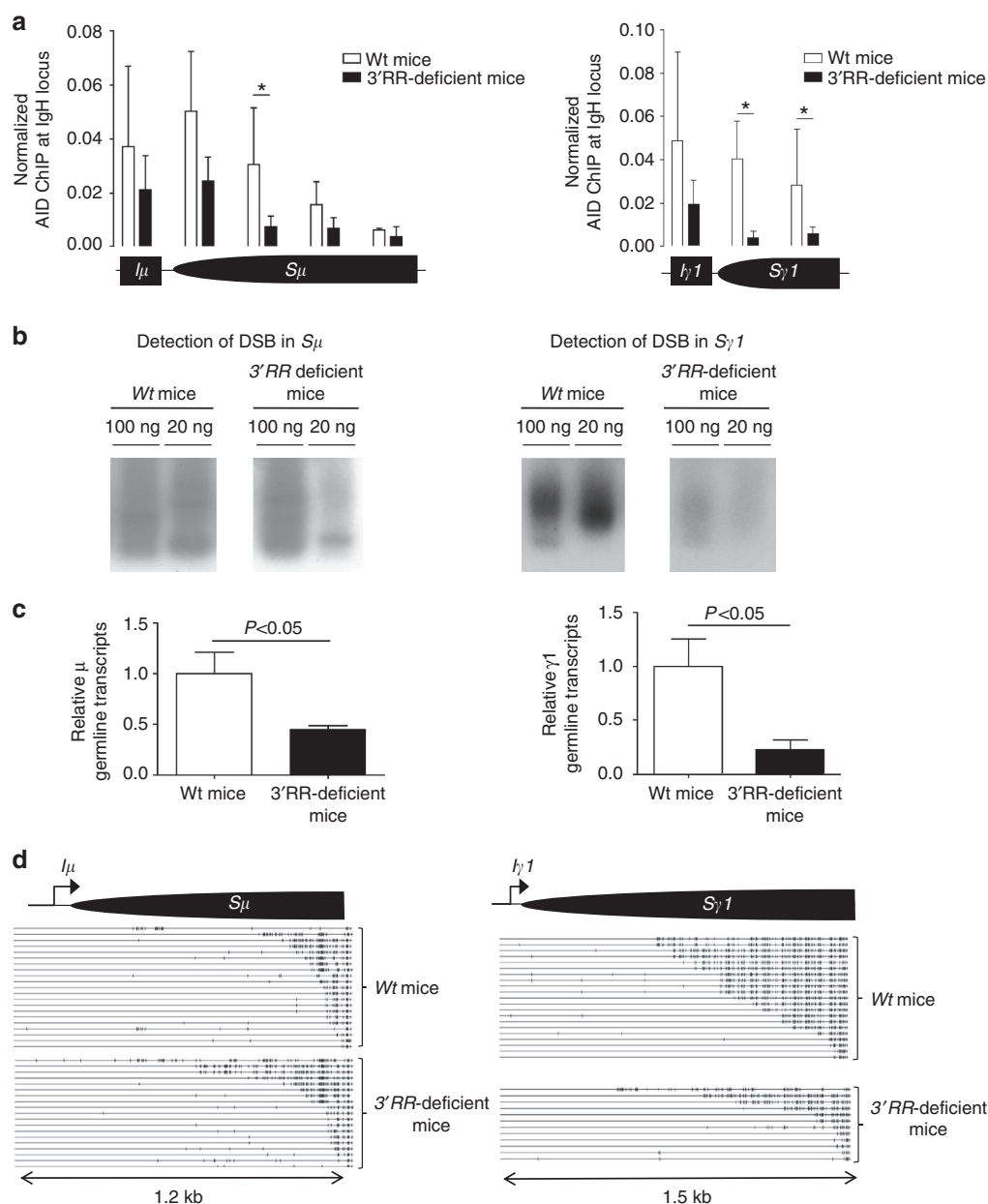


Figure 3 | AID and CSR in 3'RR-deficient mice. (a) AID ChIP assays were performed with splenic B cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of six independent experiments with two mice. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test). (b) Ligation-mediated PCR. Splenic B cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Genomic DNA from wt and 3'RR-deficient mice were treated with T4 DNA polymerase (T4 Pol), ligated with T4 DNA ligase and probed for double-stranded breaks in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ by semi-nested PCR. Reactions with 100 and 20 ng of DNA are shown. Data are representative of four experiments each with one mouse per genotype. (c) Real-time PCR analysis of I_{μ} - C_{μ} and $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts in 3 days LPS + IL4 cultured B cells. Values were normalized to *Gapdh* transcripts. Data are the mean \pm s.e.m. of 8 to 11 independent experiments with 1 mouse (Mann-Whitney *U*-test for significance). (d) Detection of R loops in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. DNA was extracted, bisulfited, treated and sequenced to detect single strand in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ regions. Each long line represents an independent sequence. The small vertical bars on each line indicate a C on the sequence converted to a T, indicating that the sequence was in a single-strand conformation. Pooled results from six independent experiments each with one mouse per genotype.

implicated in the targeting of the CSR machinery (including AID and RNA Pol II) to *S* regions primed for CSR^{25–28}. Altogether with DNA transcription, this remodelling of chromatin in *S* regions constitutes a hallmark of the accessibility to CSR factors. As shown in Fig. 5, except for acetylated lysine 9 in histone H3 (H3K9ac), levels of H3 acetylation (H3ac), H4 acetylation (H4ac) and trimethylated lysine 4 in histone H3 (H3K4me3) were not affected by the deletion of 3'RR enhancers in the I_{μ} - S_{μ} - C_{μ} region

during IgG₁ CSR induced by LPS + IL4 stimulation. In contrast, H3ac, H3K4me3 and H3K9ac were dramatically lowered in the $P_{\gamma 1}$ - $I_{\gamma 1}$ - $S_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ region (while H4ac was unchanged) (Fig. 5). Interestingly, the H3K4me3 and H3K9ac marks are required for efficient CSR and further AID recruitment^{27,28}. As reported above for AID and RNA Pol II, this study of the epigenetic marks required for CSR shows that the 3'RR mostly acts on accessibility of the acceptor $S_{\gamma 1}$ rather than the donor S_{μ} region during S_{μ} - $S_{\gamma 1}$

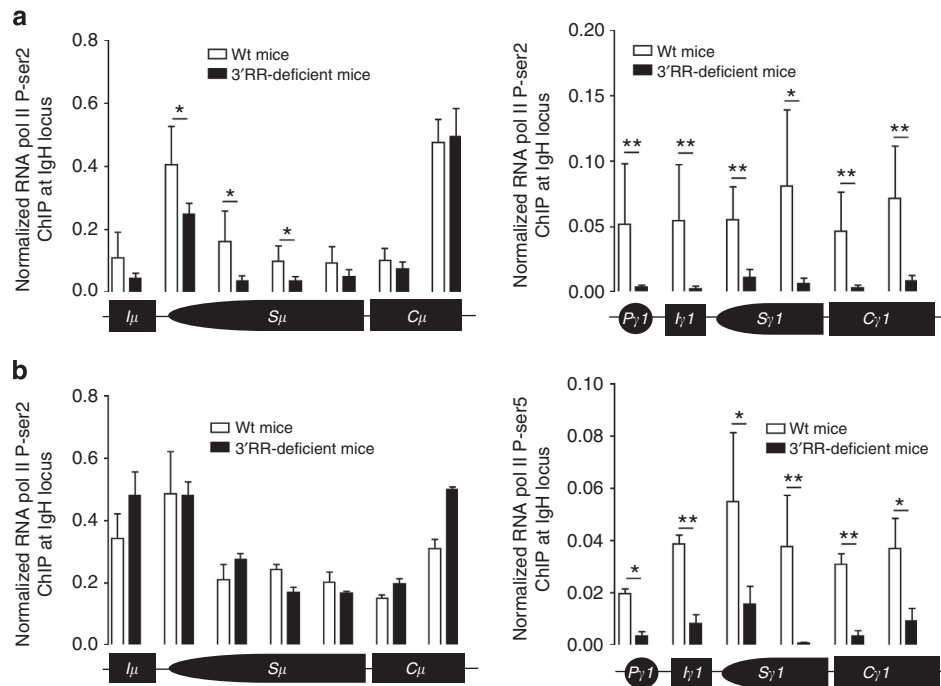


Figure 4 | RNA Pol II during CSR in 3'RR-deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. RNA Pol II P-ser 2 (**a**). RNA Pol II P-ser 5 (**b**). Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of three experiments with two mice for each genotype. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U-test).

CSR. This suggests that a reduction in histone acetylation is the most upstream defect after 3'RR deletion. The levels of histone acetylation are reversibly controlled by the balanced counteraction of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Although HDAC inhibitor treatment have been used to reverse the heterochromatin silencing of *Ig* minigenes²⁹, these drugs are potent inhibitors of the 3'RR in B cells. Thus, treatment of B cells with the HDAC inhibitor trichostatin A represses *IgH* gene transcription, CSR and Ig synthesis in B splenocytes³⁰. We confirmed that IgG₁ CSR was strongly decreased in activated B-cells treated with trichostatin A, valproic acid or SAHA; three HDAC inhibitors (Supplementary Fig. 3). Therefore, ChIP assays of epigenetic marks should be preferred over HDAC inhibitor treatments to study CSR in the *IgH* locus. How 3' RR recruits histone acetyltransferases (if any) remains an open question. Studies suggested that levels of histone acetylation in the *IgH* locus are predominantly controlled by HDACs, but that the various HDACs might have opposite effects. ChIP experiments reported HDAC1 recruitment by the central *hs1,2* enhancer of the 3'RR³⁰ and *IgH* transcription decreased in HDAC1-deficient chicken B cells³¹. By contrast, HDAC2 inhibited transcription and recombinational activities at the *IgH* locus³¹.

Effect of the 3'RR on *S*_{γ3,2b,e} acceptor regions during CSR. Other CSR-related *S* acceptor regions are located all along the *IgH* locus (Supplementary Fig. 1a). As previously reported the 3'RR not only interacts with *S*_{γ1} but also other *S* regions including *S*_{γ3}, *S*_{γ2b} and *S*_ε¹⁶. We evaluated what happens for *S*_{γ3}, *S*_{γ2b} and *S*_ε after appropriate *in vitro* CSR stimulations. Similarly to *S*_{γ1}, we found a dramatic decrease of AID, pol II, paused pol II recruitments and H3K9ac/H3K4me3 levels in *S*_{γ3}, *S*_{γ2b} and *S*_ε in B cells of 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Fig. 6). Taken altogether, these results reveal a similar mechanistic role of the 3'RR on *S* acceptor regions during CSR and confirm its key role on Ig production^{6,7}.

Transcriptional profiles of 3'RR-deficient B cells. Transcriptional profiles evidenced differences between splenic B cells of 3'RR-deficient and *wt* mice (Supplementary Table 3). Several genes implicated in interferon-related functions, inflammation, cell trafficking and B-cell homing were affected in resting B splenocytes of 3'RR-deficient mice (accession number GSE45230, Gene Expression Omnibus database). Since the *cis*-regulatory element 3'RR is not expected to modulate genes outside the *IgH* locus, these differences rather involve the recently reported decreased accumulation of marginal zone B cells in 3'RR-deficient mice³². Accordingly, functions of the affected genes fit well with roles of marginal zone B cells in infection, inflammation and immunity. After 3 days LPS + IL4 stimulation, some genes were differentially affected (Supplementary Table 4). In relations with the marked influence of the 3'RR on histone modifications during CSR, inhibitors of histone acetyltransferase (*Anp32a*, *Tle1*), histone demethylase (*Eco1*) and histone deacetylase (*Cbl-b*) are overexpressed in stimulated 3'RR-deficient splenocytes as compared with *wt* cells. In agreement with lower frequency of DSB, genes implicated in DSB detection and reparation were either downregulated (*Atm*, *Lig4*) or upregulated (*Parp-3*, *H2afx*, *Ino80* and *Esco1*). While a direct effect of the *cis*-regulatory 3'RR on genes located outside of the *IgH* locus is unlikely, gene variations rather appear related to incomplete CSR. Strikingly, RNA sequencing analysis did not identify similar gene variation in LPS + IL4 stimulated AID-deficient splenic B cells (thus lacking any AID-mediated DNA lesions) compared with *wt*³². This suggests that genes implicated in CSR repair are highly regulated and only transiently expressed in *wt* cells in response to DSBs in *S*_μ and *S*_{γ1}. AID-deficient and 3'RR-deficient mice carry CSR defect by completely different mechanisms, with, respectively, a lack of DSBs (both on *S*_μ and *S*_{γ1}) or a biased occurrence of DSBs (normally targeting *S*_μ but not *S*_{γ1}). Gene variations in 3'RR-deficient mice are thus likely not reflecting simply the lack of CSR *per se*, but rather the status of cells poised for CSR, some of them displaying DSBs in *S*_μ, and unable to

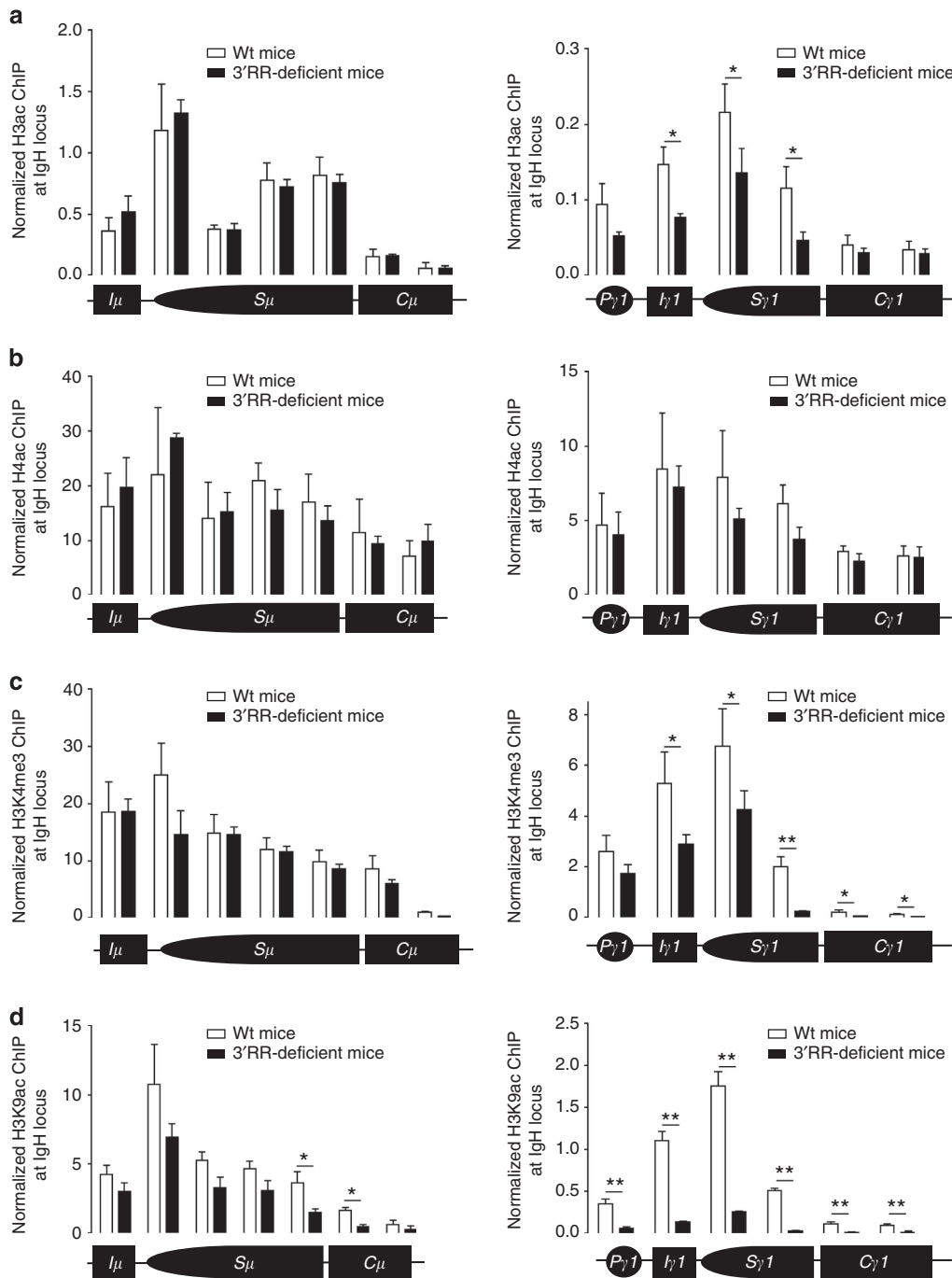


Figure 5 | Epigenetic marks (H3ac, H4ac, H3K4me3 and H3K9ac) in *S_μ* and *S_{γ1}* during IgG₁ CSR in 3'RR-deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B-cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean ± s.e.m. of three (for 3'RR-deficient mice) and six (for wt mice) independent experiments with two mice (Mann-Whitney U-test for significance).

efficiently repair these DSBs through long-range recombination with a distant acceptor region. In conclusion, we favour the hypothesis that persistent DNA damage in *S_μ* would increase the expression of genes involved in DNA-repair in 3'RR-deficient B cells.

miRNA analysis in 3'RR-deficient B cells. If the hypothesis that persistent DNA damages in *S_μ* affect gene expression profiles in 3'RR-deficient B-cells is correct, variation might also be evidenced

at the miRNA level. To further explore how the 3'RR deletion impacts the activation of B cells during CSR, we measured the expression of a panel of 84 miRNA known to be involved in B-cell development and activation. We investigated miRNA in LPS + IL4 stimulated AID-deficient splenic B-cells and found 18 downregulated miRNA and 2 up-regulated miRNA compared with wt mice (Supplementary Fig. 4). In contrast, 0 miRNA were downregulated and 11 miRNA were up-regulated in 3'RR-deficient mice (Supplementary Fig. 4) compared with wt mice. Up-regulated miRNA in 3'RR-deficient mice have hundreds of

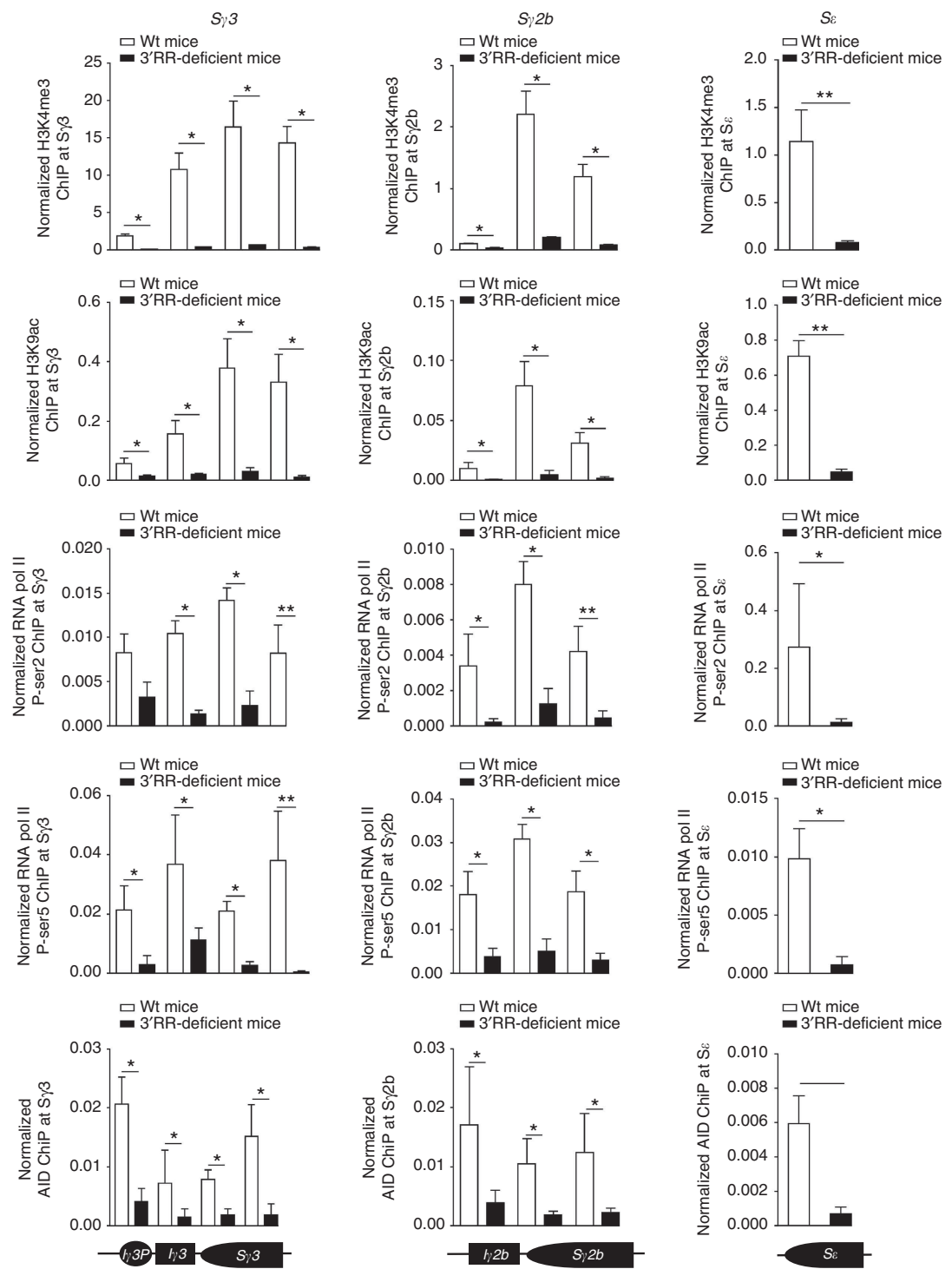


Figure 6 | Epigenetic marks, AID and pol II recruitments in $S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 2b}$ and S_{ϵ} during CSR in $3'RR$ -deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B-cells from $3'RR$ -deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS for 2 days for $S_{\gamma 3}$ and $S_{\gamma 2b}$. Cells were stimulated with LPS \pm IL4 for 2 days for S_{ϵ} . Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of three to six independent experiments with two mice for each genotype (Mann-Whitney U-test for significance).

predicted targets, including *Atm*, *Ssb1*, *Ino80*, *Exo1*, *Smarcd1*, *Dclre1b* and *Atmin*, which have been shown to regulate DSB resection and homologous recombination^{33–38}, and histone modifying enzymes *Hdac9* and *Esco1*. Interestingly, HDAC9 is required for DSB reparation by homologous recombination³⁹, and its deletion affects antibody secretion⁴⁰. Altogether, this might inhibit A-EJ, by downregulating gene implicated in micro-

homology based DSB repair (*Atm*, *Atmin*, *Ssb1* and *Hdac9*), and to favour NHEJ by upregulating *Parp-3*⁴¹, and *Esco1*, which influence the interaction between cohesion complex and DNA required for efficient NHEJ^{42,43}. A-EJ has been shown to facilitate oncogenic translocations to *IgH* locus and to be less restricted to intrachromosomal joining than NHEJ²⁰. This might be a protective mechanism limiting oncogenic translation to S_{μ} , in

which DSBs appear quite frequently while there are few in downstream acceptor regions. In parallel, LM-PCR did not show accumulation of DSBs in S_{μ} in $3'RR$ -deficient mice, despite the lack of complete CSR, suggesting that intraswitch junctions, which occur normally, are the usual mean that can be used by B cells to resolve abortive CSR issues. Finally, taken altogether results of miRNA analysis reinforce the hypothesis that the prolonged presence of DNA damage in S_{μ} would affect gene expression in $3'RR$ -deficient B-cells rather than the hypothetical loss of $3'RR$ trans-interactions with these genes in the nuclei.

Discussion

In the present study we show that the $3'RR$ promotes IgG₁ CSR not only by fostering germline transcription but also histone modifications (especially H3K4me3 and H3K9ac), formation of R loops, loading and pausing of RNA Pol II, AID recruitment and finally generation of DSBs in the $S_{\gamma 1}$ region, indicating that the $3'RR$ enhancers act as soon as these initial steps of the CSR process. In contrast to the $S_{\gamma 1}$ region, S_{μ} appears as more or less $3'RR$ -independent, suggesting that other regulatory elements are required for its CSR formatting. In a previous study Wuerffel *et al.*¹⁶ demonstrated with 3C assay and *hs3b/hs4*-deficient mice that the $3'RR$ interacted with the $S_{\gamma 1}$ region whereas S_{μ} was closely associated with E_{μ} . Moreover the non conventional IgD CSR (between S_{μ} and a S_{δ} -like region) occurs independently of the $3'RR$ ⁷. Our study thus validates at the DNA level the hypothesis that during CSR, the $3'RR$ especially targets the S acceptor region rather than the S_{μ} donor region. Although the E_{μ} enhancer could be proposed to support S_{μ} accessibility when the $3'RR$ is deleted, it is noteworthy that it is not itself mandatory for CSR³. The $3'RR$ -independence of S_{μ} is also somehow striking comparing with the known $3'RR$ -dependence of pV_H promoters and rearranged *VDJ* regions with regards to AID recruitment and SHM⁸. Finally, that $S_{\gamma 1}$ accessibility to CSR is only partly altered in the absence of the $3'RR$ allowed to study residual CSR junctions, showing that their molecular features were indiscernible from those of *wt* junctions studied in parallel. This suggests that the $3'RR$ contribution to CSR is restricted to the early steps of accessibility, AID recruitment and synapsis of target regions, but with no role in the repair and final resolution of CSR. Our analysis also showed that B-cells are able to transiently modify their transcriptome and miRNome during CSR to foster rapid and precise repair of DSBs, thus diminishing the risk of potentially oncogenic translocation.

Methods

Mice. The 129 *wt* mice (from Charles Rivers Laboratories, France) and $3'RR$ -deficient mice (from UMR CNRS 7276, Limoges, France; in a 129 background) were used. Mice of 2–3 months old (male and female) were investigated. Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation.

Spleen cell cultures for CSR. Single-cell suspensions of CD43[−] spleen cells were cultured 3 days at 1×10^6 cells ml^{-1} in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, $5 \mu g ml^{-1}$ LPS with or without $20 ng ml^{-1}$ IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ)⁶.

Cell cytometry analysis. Single-cell suspensions of cultured B cells were incubated with anti-B220-SpectralRed (PC5)-labelled antibodies (Biolegends, ref:103210, $10 \mu g ml^{-1}$ final) and anti-IgG₁-fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled antibodies (Southern Biotechnologies, ref:107002, $10 \mu g ml^{-1}$ final) and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson)^{44,45}.

Cloning and sequencing of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions. Three days *in vitro* stimulated splenocytes were harvested and DNA was extracted for investigation of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions. Junctions were studied using a touch-down PCR followed with a nested PCR using the following parameters: Touch-down PCR: Forward primer 5'-AGA GACCTGCAGTTGAG GCC-3' and backward primer 5'-AGGATGTCCACCT

CACCCAGGC -3' (1 cycle, 98 °C for 30 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 69 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 67 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 25 cycles, 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 90 s 1 cycle, 72 °C for 7 min). Nested PCR: Forward primer 5'-CCAGCCACA GTAATGACCCAG-3' and backward primer 5'-TTGTTATCCCCATCCTGTC ACCT-3' (1 cycle, 98 °C for 30 s; 35 cycles, 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 1 cycle, 72 °C for 7 min). The PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer).

Southern blotting of C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ junctions. S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions amplified as previously described were subjected to 1% agarose gel electrophoresis, and transferred overnight on a positively charged Nylon hybridization membrane (MP Biomedicals). A 507 bp probe was amplified using the following primers: Forward primer 5'-GGCAGATTAGAATGAATGCACCTG-3', backward primer 5'-TTGTTATCC CCCATCCTGTCACCT and ³²P-labelled using Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare) according to the manufacturer protocol. The membranes were saturated with salmon sperm DNA ($4 mg ml^{-1}$) and incubated with the labelled probe overnight at 42 °C. Membrane were then washed for 15 minutes twice at room temperature in 2X SSC buffer + 0.1% SDS, then 5 minutes at 52 °C in 0.1X SSC + 0.5% SDS. Membranes were autoradiographed on X50 hyperfilm MP (GE Healthcare) at −80 °C for 6 hours and revealed using Carestream Kodak autoradiography GBX developer and fixer (Sigma Aldrich).

IgG₁ Elisa assays. Blood samples were recovered from 12 weeks-old transgenic mice and *wt* controls. Serum samples were recovered by centrifugation and stored at −20 °C until used. B splenocytes were cultured for 3 days with LPS + IL4. At day 3, 1×10^6 cells were cultured for 24 h in growth medium without LPS + IL4. Culture supernatants were recovered and stored at −20 °C until used. Culture supernatants and sera were analysed for the presence of IgG₁ by ELISA^{6,44,45}. ELISA assays were performed in polycarbonate 96 multiwell plates, coated overnight at 4 °C ($100 \mu l$ per well) with $2 \mu g ml^{-1}$ IgG₁ (Cell Lab, ref:731863) in 0.05 M Na₂CO₃ buffer. After three successive washing steps in phosphate-buffered saline (PBS) buffer, a blocking step was performed (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 30 min at 37 °C. After three washing steps, $50 \mu l$ of sera (first diluted to 1:50), supernatants or standard IgG₁ (Beckman Coulter, ref:731907, $1 mg ml^{-1}$, first diluted to 1:50) were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37 °C. After three washing steps, $100 \mu l$ per well of $1 \mu g ml^{-1}$ AP-conjugated goat anti-mouse IgG₁ (Southern Biotechnologies, ref: 1070041) were incubated for 2 h at 37 °C. After washing, AP activity was assayed on $1 mg ml^{-1}$ AP substrate, and blocked with addition of 3 M NaOH. Optic density was then measured at 400 nm.

Quantitative PCR of $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ and I_{μ} - $C_{\gamma 1}$ transcripts. Two days *in vitro* stimulated splenocytes were collected and RNA was extracted for investigation of $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts. RNA and cDNA were prepared using standard techniques. Quantitative PCR was performed using power SYBR green (Applied Biosystems): $I_{\gamma 1}$ forward primer: 5'-GGCCCTTCC AGATCTTTGAG-3'; $C_{\gamma 1}$ reverse primer: 5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'. I_{μ} forward primer: 5'-ACCTGGGAAT GTATGGTTGTGGCTT-3'. C_{μ} reverse primer 5'-TCTGACCTTCAAGTAGCT TCTTG-3'. $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ and I_{μ} - $C_{\gamma 1}$ transcripts were normalized to *Gapdh* transcripts (reference Mm99999915-g1).

ChIP experiments. Splenic B cells were purified by CD43 magnetic cell sorting from nonimmunized mice and cultured *in vitro* with $5 \mu g ml^{-1}$ LPS with or without $20 ng ml^{-1}$ IL4 for 2 days. ChIP experiments were done essentially as previously described⁸. In brief, 3×10^7 stimulated B cells were cross-linked at 37 °C for 15 min in 15 ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4 °C with $100 \mu l$ of 50% protein A/G slurry ($0.2 mg ml^{-1}$ sheared salmon sperm DNA, $0.5 mg ml^{-1}$ BSA, and 50% protein A/G; Sigma). $0.3 - 0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3 - 5 \times 10^6$ cell equivalents were incubated overnight with specific or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. PCR primers used for Q-PCR are detailed in the Supplementary Table 2. The following antibodies were used: anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473), anti-H3K9ac (Millipore, 06-942), anti-H3ac (Millipore, 06-599), anti-H4ac (Millipore, 06-866), anti-RNA Pol II P-ser2 (Abcam, ab5095) and anti-RNA Pol II P-ser 5 (Abcam, ab5131). Anti-AID antibodies were kindly provided by Dr P. Gearhart.

Ligation-mediated PCR. LM-PCR was used to highlight the presence of DSBs in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. LM-PCR experiments were schematized in the Supplementary Fig. 1b. Splenocytes were stimulated with LPS + IL4 for 2 days. Genomic DNA was

extracted and treated with T4 DNA polymerase which trims back 3' overhangs while 'filling in' 3'-recessed ends, thereby yielding blunt 5'-phosphorylated DNA ends. DNA was then ligated with T4 DNA ligase with the double-strand anchor linker BW²². DSBs were detected by semi-nested LM-PCR using BW1 primer targeting the BW linker sequence and a primer specific to S_{μ} or $S_{\gamma 1}$. DSB were studied after hybridization with ³²P-labelled probes located on S_{μ} and $S_{\gamma 1}$, respectively.

R loops. R loops were analysed using bisulfite conversion of single-strand DNA⁴⁶. R loop experiments were schematized in the Supplementary Fig. 1c. Splenic B-cells from *wt* and 3'RR-deficient mice were stimulated *in vitro* with 5 µg ml⁻¹ LPS and 20 ng ml⁻¹ IL4 for 2 days. DNA was extracted and purified using Phase Lock gel (5 Prime), and digested with EcoRI (New England Biolabs) for 8 h. DNA was bisulfite converted using the EpiMark Bisulfite Conversion Kit (New England Biolabs). Five micrograms were incubated in Bisulfite mix at 37 °C for 15 h. Converted DNA was then desulfonated and purified according to the manufacturer protocol, and resuspended in 60 µl H₂O. We made touch-down PCR reaction (One Taq Hot start DNA polymerase, NEB) using a forward native primer and a reverse primer designed to match the converted sequence. For S_{μ} : forward primer 5'-GCT GCTCTTAAAGCTTGT AAACGTGTTCT-3' and backward primer 5-CTCACCC CATCTCAACTACTCCAAAA TAA-3'; (1 cycle, 94 °C for 30 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 56 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 54 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 25 cycles, 94 °C for 15 s, 53 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 1 cycle, 68 °C for 5 min). For $S_{\gamma 1}$: forward primer 5'-TTCCAGATCTTTGAGTCATCCTATC-3' and backward primer 5-CACCCAT CAACTCTA ACCATATAATATTTACTC-3'; (1 cycle, 94 °C for 30 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 52 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 51 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 50 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 25 cycles, 94 °C for 15 s, 49 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 1 cycle, 68 °C for 5 min). The PCR products were cloned and sequenced as described for S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions.

Transcriptome analysis. mRNA was extracted from B220⁺ splenic B-cells of 3'RR-deficient mice and *wt* mice before and after 3 days LPS + IL4 stimulation. Microarray experiments were done in 'Nice - Sophia Antipolis Microarray Facility' (France). Statistical analysis was made with the Bioconductor open source software, particularly its Limma package^{47–50}. The microarray data presented in this article have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) under the accession numbers GSE45230.

miRNA analysis. Splenic B cells from *wt*, AID-deficient mice and 3'RR-deficient mice were stimulated *in vitro* with 5 µg ml⁻¹ LPS and 20 ng ml⁻¹ IL4 for 2 days, and total RNA was extracted. cDNA was prepared using QIAGEN miScript II RT kit, and expression of a panel of 84 miRNA was determined using QIAGEN miScript miRNA PCR Array Mouse T-Cell and B-Cell activation, according to the manufacturer's protocol. miRNA targets predictions were made using the <http://mirdb.org/> website⁵¹.

References

- Henderson, A. & Calame, K. Transcription regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 163–200 (1998).
- Pinaud, E. *et al.* The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
- Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. & Pinaud, E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 14362–14367 (2005).
- Marquet, M. *et al.* The Eµ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response *in vivo*. *J. Immunol.* **193**, 1171–1183 (2014).
- Saintamand, A. *et al.* The IgH 3' regulatory region governs µ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* **6**, 4845–4852 (2015).
- Vincent-Fabert, C. *et al.* Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* **116**, 1895–1898 (2010).
- Rouaud, P. *et al.* Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
- Rouaud, P. *et al.* The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
- Rouaud, P. *et al.* Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* **287**, 8356–8360 (2012).
- Medvedovic, J. *et al.* Flexible long-range loops in the VH gene region of the IgH locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* **39**, 229–244 (2013).
- Yan, T. C. *et al.* IgH class switching and translocations used a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**, 478–483 (2007).
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A. & Pan-Hammarström, Q. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* **108**, 45–109 (2010).
- Boboila, C., Alt, F. W. & Schwer, B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* **116**, 1–45 (2012).
- Matthews, A. J., Zheng, S., DiMenna, L. J. & Chaudhuri, J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* **122**, 1–57 (2014).
- Vaidyanathan, B., Yen, W. F., Pucella, J. N. & Chaudhuri, J. AIDing chromatin and transcription-coupled orchestration of immunoglobulin class-switch recombination. *Front. Immunol.* **5**, 120 (2014).
- Wuerffel, R. *et al.* S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711–722 (2007).
- Cogné, M. *et al.* A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* **77**, 737–747 (1994).
- Pinaud, E. *et al.* Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187–199 (2001).
- Xu, M. & Stavnezer, J. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line γ1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* **11**, 145–155 (1992).
- Boboila, C. *et al.* Alternative end-joining catalyses robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and ku70. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 3034–3039 (2010).
- Laffleur, B. *et al.* AID-induced remodelling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* **5**, 1118–1131 (2014).
- Zan, H. & Casali, P. AID- and UNG-dependent generation of staggered double-strand DNA breaks in immunoglobulin class switch DNA recombination: a post-cleavage role for AID. *Mol. Immunol.* **46**, 45–61 (2008).
- Kracker, S. *et al.* Impaired induction of DNA lesions during immunoglobulin class-switch recombination in humans influences end-joining repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 22225–22230 (2010).
- Kenter, A. L. AID targeting is dependent on RNA polymerase II pausing. *Semin. Immunol.* **24**, 281–286 (2012).
- Kuang, F. L., Luo, Z. & Scharff, M. D. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 5288–5293 (2009).
- Stanlie, A., Masatoshi, A., Muramatsu, M., Honjo, T. & Begum, N. A. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 22190–22195 (2010).
- Jeevan-Raj, B. P. *et al.* Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **208**, 1649–1660 (2011).
- Daniel, J. A. & Nessenzweig, A. Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin class-switch recombination. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 733–738 (2012).
- Bühler, M., Mohn, F., Stalder, L. & Mühlemann, O. Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell.* **18**, 307–317 (2005).
- Lu, Z. P., Ju, Z. L., Shi, G. Y., Zhang, J. W. & Sun, J. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 204–209 (2005).
- Kurosawa, K., Lin, W. & Ohta, K. Distinct roles of HDAC1 and HDAC2 in transcription and recombination at the immunoglobulin loci in the chivken B cell line DT40. *J. Biochem.* **148**, 201–207 (2010).
- Fritz, E. L. *et al.* A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* **14**, 749–755 (2013).
- Yang, S. H. *et al.* The SOSS1 single-stranded DNA binding complex promotes DNA end resection in concert with Exo1. *EMBO J.* **32**, 126–139 (2013).
- Loizou, J. I. *et al.* ATMIN is required for maintenance of genomic stability and suppression of B cell lymphoma. *Cancer Cell.* **19**, 587–600 (2011).
- Bolderson, E. *et al.* Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1821–1831 (2010).
- Bennett, G., Papamichos-Chronakis, M. & Peterson, C. L. DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators. *Nat. Commun.* **4**, 2084 (2013).
- Costelloe, T. *et al.* The yeast Fun30 and human SMARCD1 chromatin remodellers promote DNA and resection. *Nature* **489**, 581–586 (2012).
- Wu, P., Takai, H. & de Lange, T. Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell* **150**, 39–52 (2012).
- Kotian, S., Liyanarachchi, S., Zelent, A. & Parvin, J. D. Histone deacetylases 9 and 10 are required for homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **286**, 7722–7726 (2011).

40. Yan, K. *et al.* Histone deacetylase 9 deficiency protects against effector T cell-mediated systemic autoimmunity. *J. Biol. Chem.* **286**, 28833–28843 (2011).
41. Rulten, S. L. *et al.* PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell.* **41**, 33–45 (2011).
42. Sjögren, C. & Ström, L. S-phase and DNA damage activated establishment of sister chromatid cohesion-importance for DNA repair. *Exp. Cell. Res.* **316**, 1445–1453 (2010).
43. Thomas-Claudepierre, A. S. *et al.* The cohesion complex regulates immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **210**, 2495–2502 (2013).
44. Truffinet, V. *et al.* The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* **179**, 6033–6042 (2007).
45. Vincent-Fabert, C. *et al.* Ig synthesis and class switching do not require the presence of the *hs4* enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* **182**, 6926–6932 (2009).
46. Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. & Lieber, M. R. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 442–451 (2003).
47. Rouaud, P. *et al.* Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53 +/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* **3**, 586–593 (2012).
48. Le Brigand, K. & Barbry, P. MEDIANTE: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* **23**, 1304–1306 (2007).
49. Le Brigand, K. *et al.* An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res.* **34**, e87 (2006).
50. Smyth, G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, article 3 (2004).
51. Wang, X. & El Naqa, I. M. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* **24**, 325–332 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (SL 220100601332 and PJA 20141201649), ANR (Projets Blanc 2011), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze), and 'Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud'. Epigenetic experiments were supported by a specific grant from INCa-Cancéropôle GSO (2014). M. Cogné is supported by Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale. P. Rouaud had a fellowship from ARC (DOC20130606964). We acknowledge the technological expertise of the Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform, supported by MICROENVIMET, FP7-HEALTHF2-2008-201279, the ARC, and the INCa. We thank Dr P. Barbry for helpful discussions and support during this work. We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care. We thank Dr P. Gearhart for sending us anti-AID antibodies.

Author contributions

P.R., A.S., F.S., M.C. and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. G.R. performed transcriptome experiments. M.C. and Y.D. participated in the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

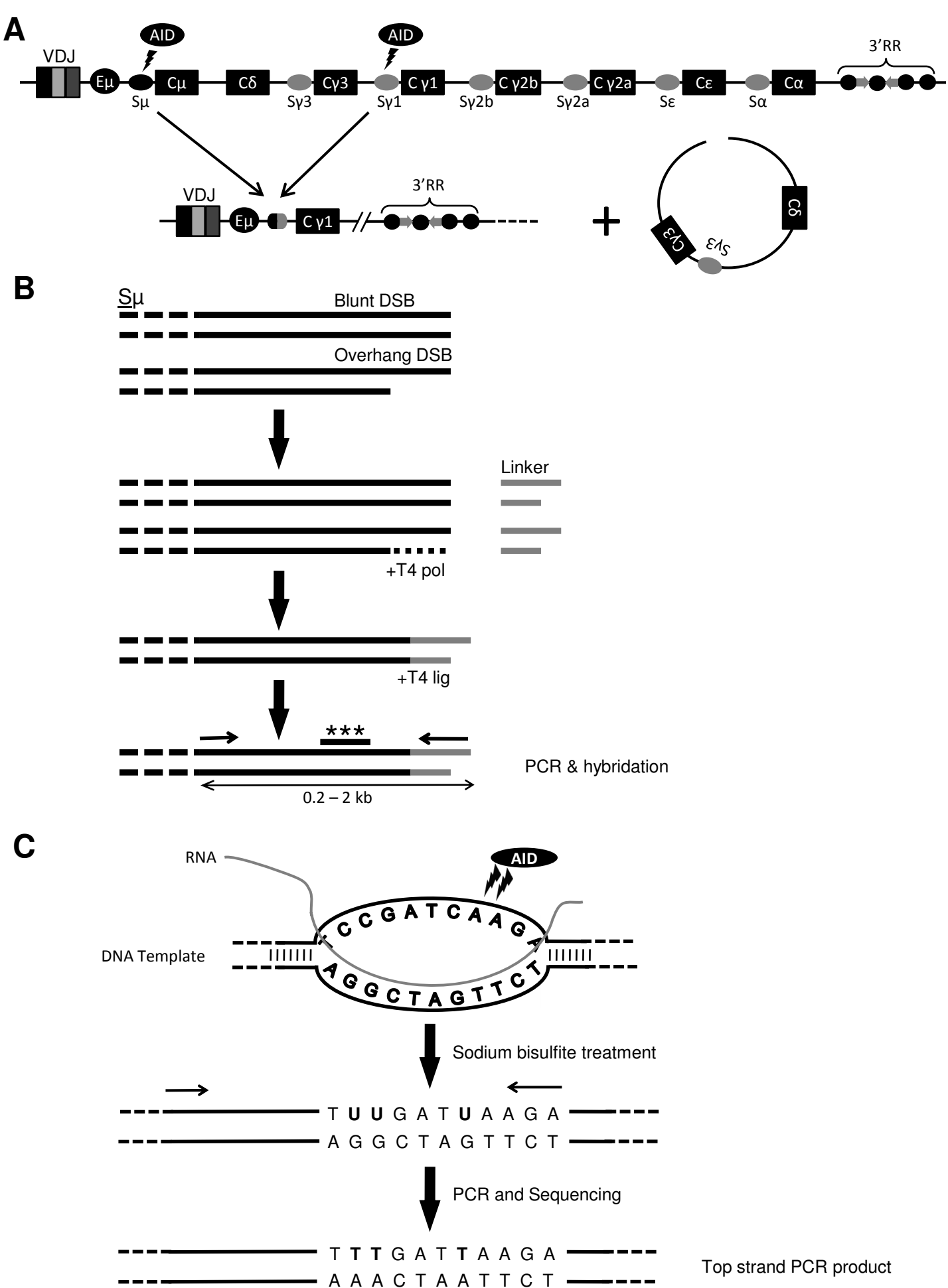
Additional information

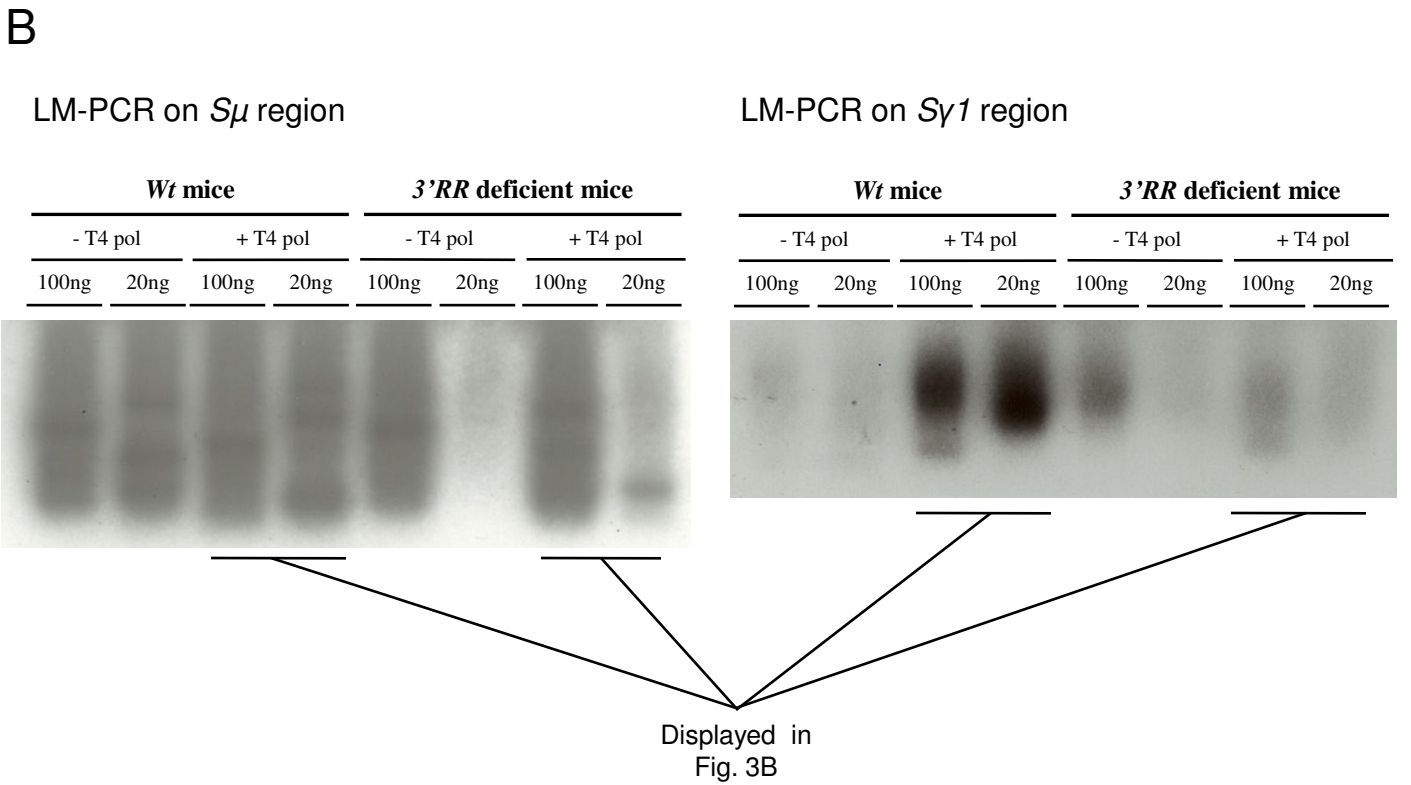
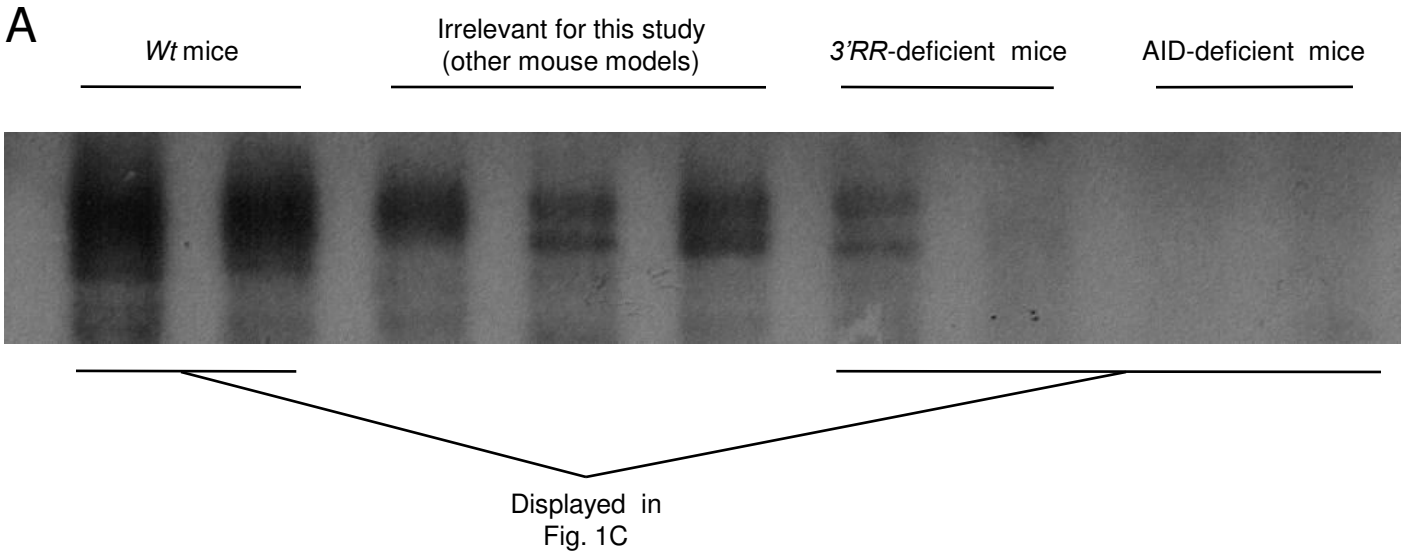
Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

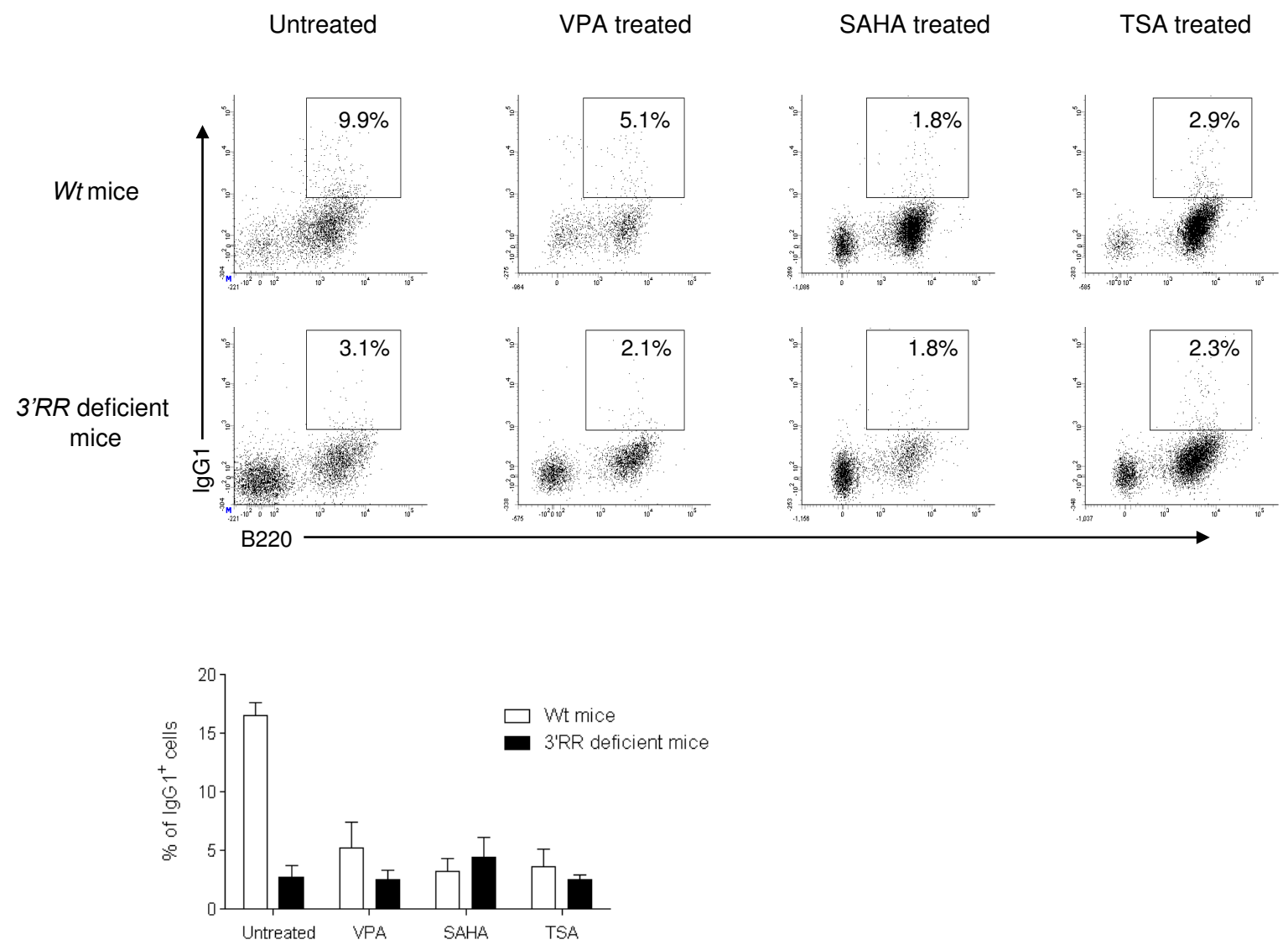
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Saintamand, A. *et al.* Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* 6:7084 doi: 10.1038/ncomms8084 (2015).



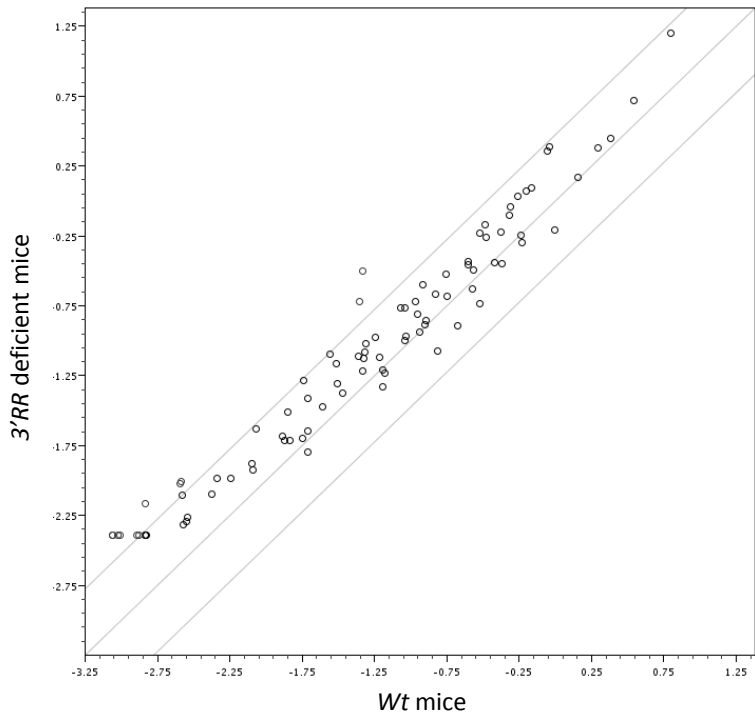


Supplementary Fig. 2 : Uncropped blots for Southern blot analysis of *Sμ-Cγ1* junctions (A) and LM-PCR experiments (B)



Supplementary Fig. 3 : Effect of three HDAC inhibitors (VPA : 120 $\mu\text{g ml}^{-1}$; SAHA : 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; TSA : 0.5 ng mL^{-1}) on IgG1 CSR in *wt* and *3'RR*-deficient mice (mean \pm SEM of 4 mice).

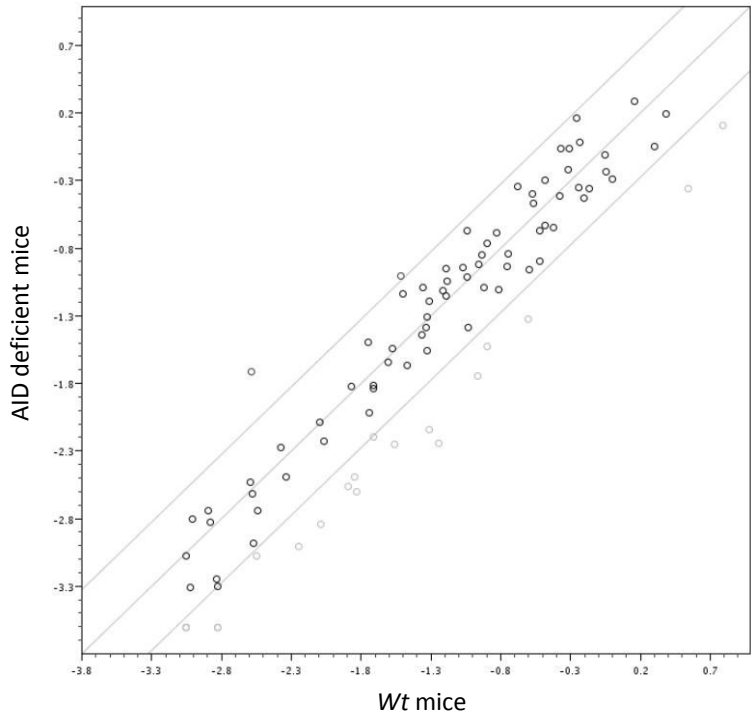
A



Overexpressed miRNA

Mature ID	Fold Regulation
mmu-let-7a-5p	4.3671
mmu-miR-1196-5p	6.7818
mmu-miR-125b-5p	4.6321
mmu-miR-126a-3p	4.6643
mmu-miR-28c	3.8018
mmu-miR-365-3p	3.1638
mmu-miR-466g	3.7235
mmu-miR-467b-3p	4.1315
mmu-miR-467f	4.2624
mmu-miR-669e-5p	4.6161
mmu-miR-669f-3p	3.056

B



Overexpressed miRNA

Mature ID	Fold Regulation
mmu-miR-139-5p	3.234
mmu-miR-28c	7.4556

Underexpressed miRNA

Mature ID	Fold Regulation
mmu-miR-1187	-7.9539
mmu-miR-125b-5p	-5.945
mmu-miR-15a-3p	-3.014
mmu-miR-182-5p	-5.945
mmu-miR-31-5p	-3.3792
mmu-miR-326-3p	-4.3671
mmu-miR-346-5p	-5.6048
mmu-miR-466f-5p	-6.7818
mmu-miR-466h-5p	-6.0071
mmu-miR-466j	-4.8962
mmu-miR-483-5p	-5.7624
mmu-miR-574-5p	-4.8793
mmu-miR-669e-5p	-3.5349
mmu-miR-669o-5p	-4.7294
mmu-miR-672-5p	-9.9982
mmu-miR-714	-5.2659
mmu-miR-762	-5.8835
mmu-miR-93-5p	-4.2477

Supplementary Fig. 4 : miRNA levels in two days LPS+IL4 treated B-splenocytes of wt, AID-deficient mice and 3'RR-deficient mice (two independent experiments with two mice).

Article 4

The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Armand Garot, Faten Saad, Claire Carrion, Christelle Oblet, Michel Cogné, Eric Pinaud & Yves Denizot

Oncotarget. 2015, Volume 6, numéro 7, pages 4845-4852

La délétion de la 3'RR entraîne une diminution de la transcription du locus IgH. Nous avons donc cherché à déterminer l'impact que cette délétion pourrait avoir sur le développement lymphocytaire B en agissant sur l'expression du BCR. En effet, le BCR transmet dès sa formation des signaux en continu à la cellule. Ils vont influencer sur sa destinée (Niiri and Clark, 2002). Cette signalisation est particulièrement importante à l'issue du stade B immature où la cellule deviendra soit un B MZ, soit un B FO (Pillai and Cariappa, 2009). L'hypothèse la plus communément acceptée est qu'un signal BCR faible favorise une différenciation en B MZ, tandis qu'un signal fort induit une différenciation en B FO.

Les pourcentages de B MZ et FO peuvent varier de manière importante selon les souches de souris. Ainsi, les souris C57black/6 et sv129 présentent un ratio MZ/FO et un niveau d'expression d'IgM membranaire différents (Kaminski and Stavnezer, 2007). Pour éviter que ces différences ne faussent nos résultats, nous avons réalisé nos expériences sur des hétérozygotes issus d'un croisement entre des souris C57black/6 et sv129 (les souris 3'RR KO ayant été obtenues à partir de cellules souches de fond sv129). Les C57black/6 expriment une IgM d'allotype "b" (IgM^b), tandis que les sv129 expriment une IgM d'allotype "a" (IgM^a). Nous avons donc analysé des souris présentant un génotype $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, en comparaison avec des souris a^{wt}/b^{wt} .

Les réarrangements VDJ ayant lieu de façon aléatoire, les lymphocytes B hétérozygotes ont théoriquement autant de chance d'exprimer une IgM^a ou une IgM^b. Ceci a été confirmé par les expériences réalisées sur les souris contrôles a^{wt}/b^{wt} . Une diminution du

ratio IgM^a/IgM^b dans une population lymphocytaire B chez les souris a^{Δ3'RR}/b^{wt} indiquerait donc que la délétion de la 3'RR perturbe son développement.

Les analyses réalisées sur les lymphocytes de la moelle osseuse ont montré un nombre similaire de cellules exprimant un allèle a^{Δ3'RR} ou b^{wt}. Ces résultats montrent que la délétion de la 3'RR ne perturbe pas les réarrangements VDJ, ni les phases les plus précoces du développement B. Cependant, on note une légère augmentation du pourcentage de cellules transitionnelles IgM^{a+} qui pourrait indiquer un défaut de différenciation à partir de cette étape. Contrairement à ce que l'on a observé dans la moelle, les cellules IgM^{a+} des souris a^{Δ3'RR}/b^{wt} sont fortement désavantagées dans la rate. La délétion de la 3'RR affecte donc le développement lymphocytaire B à la transition entre les stades B immatures et matures. Dans ces souris, on distingue une forte baisse du pourcentage de B MZ IgM^{a+} tandis que le pourcentage de B FO n'est pas affecté. La délétion de la 3'RR affecte donc la différenciation des cellules B MZ.

L'expression de L'IgM^a membranaire est diminuée dans les souris a^{Δ3'RR}/b^{wt} quel que soit le stade de différenciation. Cependant, cette diminution ne semble affecter que modérément la signalisation *via* le BCR dans les B matures. L'analyse de la phosphorylation de protéines impliquées dans la cascade de signalisation n'a montré que de légères baisses non significatives. De plus, la co-localisation du BCR avec les rafts lipidiques se fait normalement dans les souris 3'RR KO.

Ces résultats semblent en opposition avec l'hypothèse généralement admise qui suggère qu'un signal BCR faible favorise la différenciation des B MZ. En effet, malgré une signalisation légèrement atténuée, la différenciation en B MZ est fortement limitée pour les cellules exprimant un allèle a^{Δ3'RR}. Ceci pourrait s'expliquer par la différence entre notre modèle, où la signalisation n'est affectée qu'à partir du stade B immature, et les modèles habituellement utilisés pour étudier le "*B cell fate*", dans lesquels la signalisation est perturbée dès le stade pré-BCR par l'altération de protéines impliquées dans la transduction du signal (Martin and Kearney, 2002). Nos résultats suggèrent que la destinée cellulaire ne dépendrait pas uniquement de la force du signal basal du BCR, mais aussi de la régulation fine de l'expression de la chaîne lourde par les éléments régulateurs du locus.

En résumé, nos travaux ont démontré que :

- La délétion de la 3'RR diminue l'expression de l'IgM membranaire dès le stade B immature. Cependant la signalisation via le BCR n'est que modérément touchée.
- L'absence de 3'RR ralentit le passage des cellules du stade B immature au stade mature et la différenciation des cellules en B MZ.
- La différenciation des lymphocytes en B MZ ou FO ne dépend vraisemblablement pas de la simple intensité du signal basal transmis par le BCR, mais requiert une régulation plus fine.

The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate

Alexis Saintamand¹, Pauline Rouaud¹, Armand Garot¹, Faten Saad¹, Claire Carrion¹, Christelle Oblet¹, Michel Cogné^{1,2,3}, Eric Pinaud¹, Yves Denizot¹

¹CNRS, CRIBL, UMR 7276, 87000 Limoges, France

²Université de Limoges, CRIBL, UMR 7276, 87000 Limoges, France

³Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence to:

Yves Denizot, e-mail: yves.denizot@unilim.fr

Keywords: BCR, B cell fate, IgH 3' regulatory enhancers, knock-out mice

Received: December 17, 2014

Accepted: December 21, 2014

Published: January 14, 2015

ABSTRACT

We report that the IgH 3' regulatory region (3'RR) has no role on μ chain transcription and pre-BCR expression in B cell progenitors. In contrast, analysis of heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice indicated that the 3'RR controls μ chain transcripts in mature splenocytes and impacts membrane IgM density without obvious effect on BCR signals (colocalisation with lipid rafts and phosphorylation of Erk and Akt after BCR crosslinking). Deletion of the 3'RR modulates the B cell fate to less marginal zone B cells. In conclusion, the 3'RR is dispensable for pre-BCR expression and necessary for optimal commitments toward the marginal zone B cell fate. These results reinforce the concept of a dual regulation of the IgH locus transcription and accessibility by 5' elements at immature B cell stages, and by the 3'RR as early as the resting mature B cell stage and then along further activation and differentiation.

INTRODUCTION

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA remodelling events [1, 2]. While 5' *cis*-regulatory elements ($E\mu$ and IGCR1) control V(D)J recombination [2–4], the IgH 3' regulatory region (3'RR) controls class switch recombination (CSR) [2, 5] and IgH somatic hypermutation (SHM) [6]. B cells are continuously instructed by B cell receptor (BCR) signals to make crucial cell fate decisions at several checkpoints during their development [7, 8]. Such an important choice made by immature B cells is to become either a follicular (FO) or a marginal zone (MZ) B cell. Influence of the BCR strength on B cell fate has been investigated by various experimental approaches (such as mutations affecting BCR components and proteins implicated in BCR signalling) both affecting pre-BCR and BCR signals and thus resulting in multiple anomalies at various stages of B cell maturation [7, 8]. The commonly accepted hypothesis is that the BCR strength controls B cell fate with weak BCR signalling inducing MZ B cell development while strong BCR signalling

favours the development of FO B cells [7, 8]. We studied heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice. We report that the 3'RR has no role on the pre-BCR expression but governs μ gene transcription and thus BCR expression specifically in mature B cells where its deletion affects the B cell fate toward less MZ B cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of a 3'RR-deleted allele in bone marrow B cells

Mouse substrains have dissimilar differentiation programs culminating in different B cell fate and BCR expression [9] (Figure 1). To assess B cell differentiation issues linked to genetic background, our study was carried out in heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, compared to *wt* F1 IgH a^{wt}/b^{wt} mice. Analysis of bone marrow B cells with IgM-allotype specific antibodies indicated similar percentages and numbers of B cells expressing either *a* or *b* allotype in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice; as a negative control IgM^a-expressing B cells were not detected in mice carrying heterozygous deletion of the $E\mu$ region ($a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$) [10]

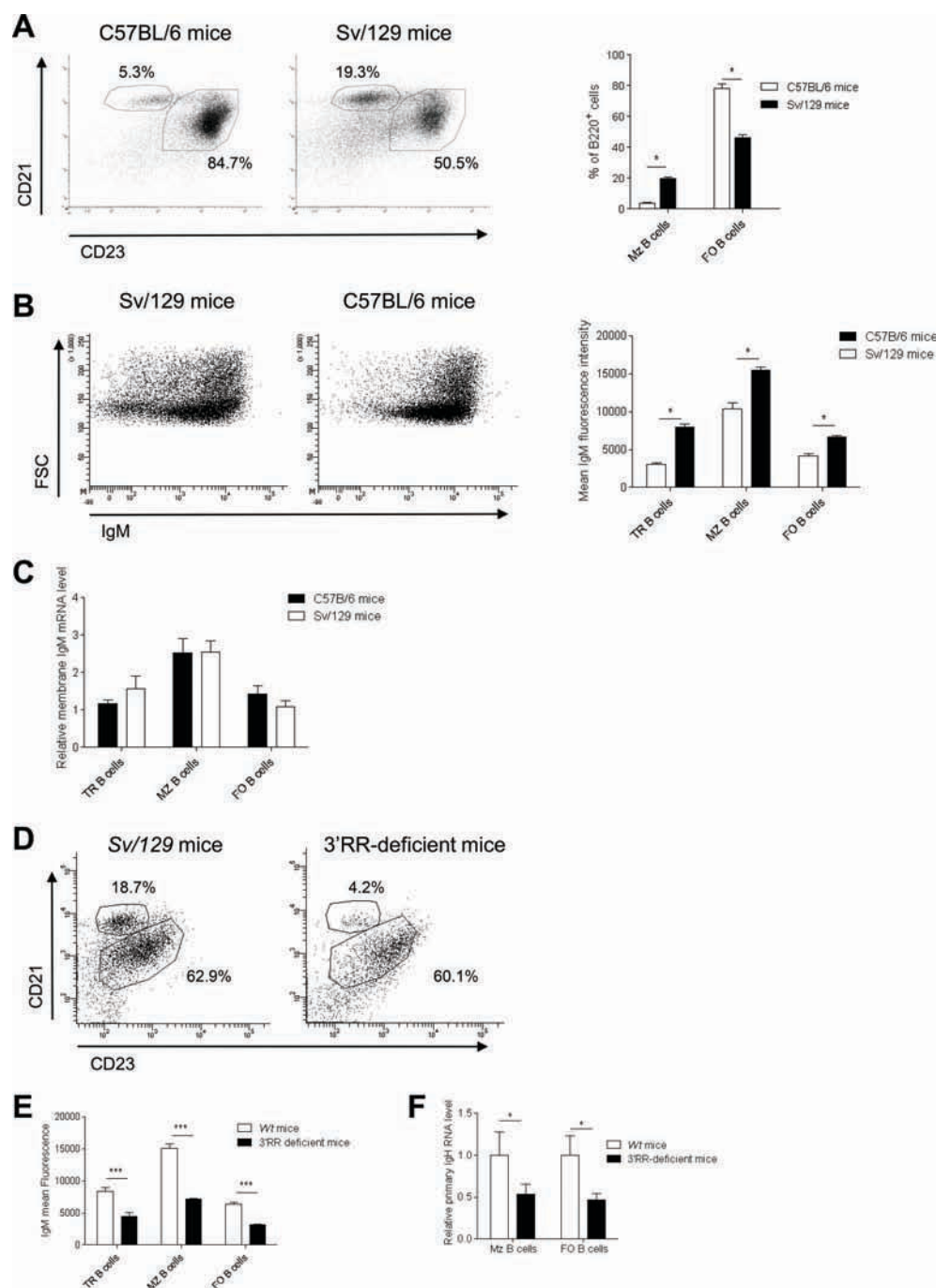


Figure 1: B cell fate and IgM expression in C57BL/6 and Sv/129 mice. (A) Left part - flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) in spleen of C57BL/6 (IgH b^{wt}/b^{wt}) and Sv/129 (IgH a^{wt}/a^{wt}) wt mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment of three Sv/129 and seven C57BL/6 mice is shown. Right part - percentage of splenic FO and MZ B cells. Mean \pm SEM of three and seven values for Sv/129 and C57BL/6 mice, respectively. * p < 0.05 (Mann-Whitney U -test). (B) Left part - flow cytometry analysis of B220⁺IgM⁺ B cells in spleen of C57BL/6 and Sv/129 mice. One representative experiment of three Sv/129 and seven C57BL/6 mice is shown. Cells were gated on B220⁺ cells. The anti-IgM labelled antibody binds both the *a* and the *b* allotypes. Right part - Mean IgM intensities on FO, MZ and transitional (TR, B220⁺AA4.1⁺) B cells in spleen of Sv/129 and C57BL/6 mice. Mean \pm SEM of three and seven values for Sv/129 and C57BL/6 mice, respectively. * p < 0.05 (Mann-Whitney U -test). (C) Similar μ transcription in sorted TR, FO and MZ B cells of Sv/129 and C57BL/6 mice. Mean \pm SEM of 5 mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. (D) Flow cytometry analysis of FO and MZ B cells in spleen of homozygous 3'RR-deficient mice (IgH a^{Δ3'RR}/a^{Δ3'RR}) and Sv/129 (IgH a^{wt}/a^{wt}) mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment out of six is shown. (E) Percentages of splenic TR, FO and MZ B cells in 3'RR-deficient mice and Sv/129 mice. Mean \pm SEM of six mice. * p < 0.001 (Mann-Whitney U -test). (F) Real time PCR analysis of primary IgH transcripts in sorted FO and MZ B cells of 3'RR-deficient mice and Sv/129 mice. Mean \pm SEM of five mice. * p < 0.05 (Mann-Whitney U -test). Values were normalised to GAPDH transcripts.

(Figure 2A and 2B). The mean membrane IgM^a (but not IgM^b) density was reduced in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2C). Analysis of immature B220⁺AA4.1⁺ B cells indicated a slight increase of the percentage (but not the numbers) of cells expressing the *a* allotype in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 2D). A decreased membrane IgM^a (but not IgM^b) density was found in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2E). Finally, real time PCR analysis indicated a reduced transcription of the *a* allele (but not *b*) in B220⁺AA4.1⁺ sorted B cells from $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2F). Taken altogether these results are indications that the 3'RR-deficient allele underwent V(D)J recombination at a rate and a timeframe similar to the *wt* allele. Indeed any delay in IgH chain expression from the mutated allele would be expected to result in unbalanced expression of IgH alleles in immature B cells from heterozygous mice (as found with the $a^{\Delta E\mu}$ allele) [10]. Bone marrow IgM $a^{\Delta 3'RR}$ B cells had a lower IgH transcription and membrane IgM expression confirming an early 3'RR transcriptional control immediately after the pre-B cell stage [11]. The slight accumulation of newly formed IgM $a^{\Delta 3'RR}$ B cells may imply a B cell fate decision defect.

Expression of a 3'RR-deleted allele in peripheral B cells

In contrast to bone marrow B-lineage cells, a strong disadvantage of the mutated *a* allotype finally manifested in mature splenic B cells of IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 3A–3C). This precisely identified the transition from immature to mature B cells as the time point where the 3'RR-deficiency altered B cell differentiation and introduced a biased representation of the mutant IgH allele. In $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, proportion (but not numbers) of splenic IgM^aAA4.1⁺ transitional (TR) B cells was increased when compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 3D, left part). Deletion of the 3'RR had no effect on FO B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) (Figure 3D, middle part) while a marked reduction of MZ B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) was found (Figure 3E, right part). The mean IgM^a (but not IgM^b) intensity was significantly reduced in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ compared to a^{wt}/b^{wt} mice in TR, FO and MZ B cells (Figure 3E). Real time PCR analysis showed a reduced IgM^a (but not IgM^b) transcription in sorted TR, FO and MZ B cells from $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ (Figure 3F). Thus, deletion of the 3'RR affected membrane IgM expression in mature B cell and the B cell fate toward the MZ phenotype. These results markedly contrast with the lower FO phenotype resulting from hypomorphic expression of either Ig α or of an IgH-chain allele, both affecting pre-BCR and BCR expression and resulting in multiple anomalies at various stages of B cell maturation [12, 13]. The cell fate decision made by immature B cells to become a FO or a MZ B cell is controlled by the BCR strength [7, 8]. We

investigated BCR signalling in homozygous $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ mice that had lower levels of MZ B cells and IgM density than in a^{wt}/a^{wt} Sv/129 mice (Figure 1). Engagement of BCR with anti-IgM stimulation efficiently induced the co-localisation between BCR and lipid rafts in 3'RR-deficient splenocytes (Figure 4) that is a prerequisite for an efficient BCR signalling [14, 15]. We show that surface Ig cross-linking induces amounts of BCR signalling (Erk and Akt phosphorylations) in 3'RR-deficient B cells without obvious differences to *wt* mice (Figure 4).

CONCLUSION

Deletion of the 3'RR had no impact on bone marrow B cell populations on the use of a 3'RR-deficient allele in competition with a *wt* allele. This reinforced studies highlighting the key role of 5' IgH locus regulatory elements in recombination and transcription at immature stages leading to pre-BCR expression [2, 3, 10, 16]. In contrast, a late developmental defect appears in peripheral B lymphocytes with an impact of the 3'RR deletion on IgH chain expression. Whether several models reported that lowered tonic BCR signalling alters B cell fate by favouring the development of MZ B cells in the detriment of FO B cells [7, 8], other studies do not [17, 18]. We show that deletion of the 3'RR lowered IgH transcription, BCR density, and BCR signalling with consequences on B cell fate, disadvantaging MZ subset in favour to FO B cells. This suggests that B cell fate might not be only governed by the BCR tonic signal but relies on fine IgH chain tuning, by multiple regulatory elements including the 3'RR, at specific stages of B cell development. While 5' IgH elements solely control IgH (and thus pre-BCR) expression at immature stages, the 3'RR comes into IgH (and thus BCR) transcriptional control in mature B cells.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation. The disruption of the 3'RR was carried out in a Sv/129 embryonic stem cell line [5]. Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Age-matched littermates (8 weeks old) were used in all experiments.

Cell cytometry analysis

Cells were incubated with anti-B220-BV510, anti-CD21-BV650, anti-CD23-PC7, anti-IgM-APC, anti-IgMa-FITC, anti-IgMb-PE, anti-CD19-APCH7 and anti-AA4.1-APC antibodies (Southern Biotechnologies and

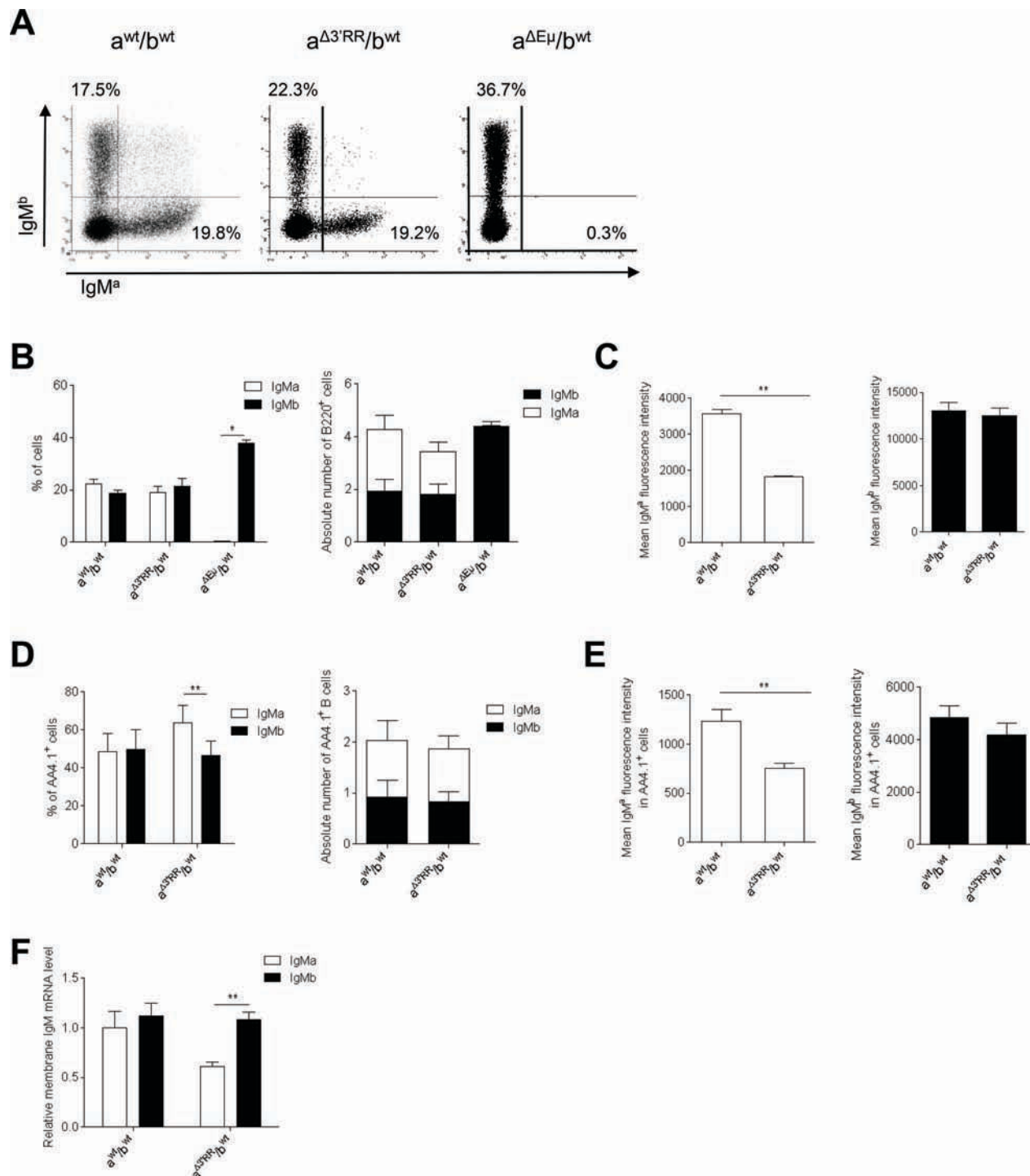


Figure 2: Expression of a 3'RR-deleted allele in bone marrow B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b on B220⁺ bone marrow cells of heterozygous *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt}, *a*^{wt}/*b*^{wt} and *a*^{ΔEμ}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of ten is shown for *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of four is shown for *a*^{ΔEμ}/*b*^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ bone marrow B cells expressing the *a* or *b* allele in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt}, *a*^{wt}/*b*^{wt} and *a*^{ΔEμ}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} mice, ten *a*^{wt}/*b*^{wt} and four *a*^{ΔEμ}/*b*^{wt} mice. Millions of bone marrow B cells are reported. **p* < 0.05 (Mann-Whitney *U*-test). (C) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺ B cells of *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (D) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (F) Real time PCR analysis of *μ* membrane transcripts in sorted B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells of *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. Mean ± SEM of six mice. **p* < 0.05 (Mann-Whitney *U*-test).

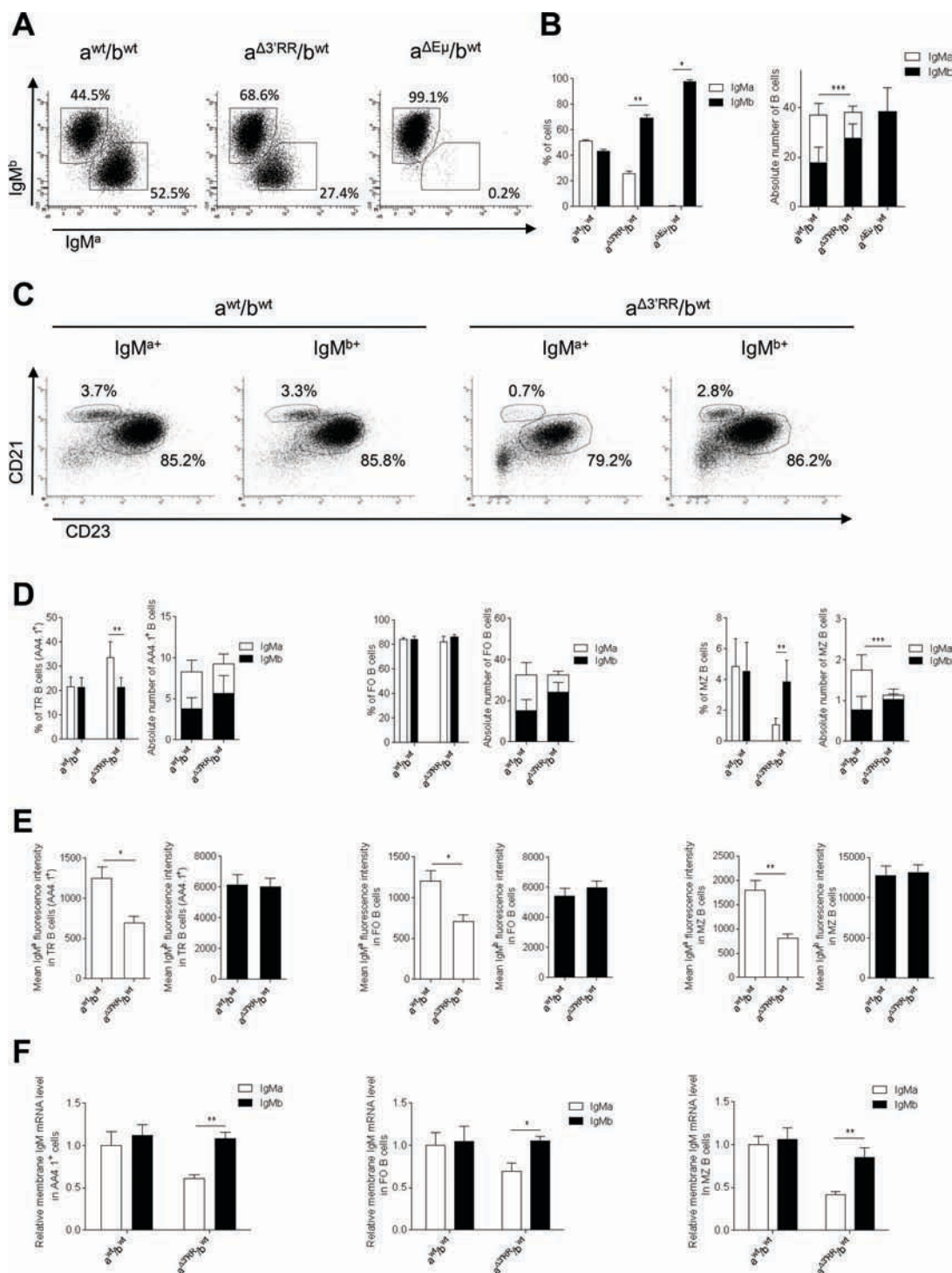


Figure 3: Expression of a 3'RR-deleted allele in splenic B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b in spleen of heterozygous $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. One representative experiment out of ten is shown for $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of four is shown for $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ splenic B cells expressing the *a* or *b* allele in $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Mean \pm SEM of ten $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ mice, ten a^{wt}/b^{wt} and four $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Millions of splenic B cells are reported. The significance is for IgM^a cells in the right part. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney *U*-test). (C) Flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) in $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of ten is shown. Cells were gated on B220⁺ cells. (D) Percentages and numbers (in millions) of TR (AA4.1⁺), FO and MZ B cells in $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. Million numbers of cells are reported. The significance is for MZ IgM^a cells in the right part. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b densities on TR, FO and MZ B cells in $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (F) μ transcription in sorted TR, FO and MZ B cells of $a^{\Delta 3RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of 6 mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test).

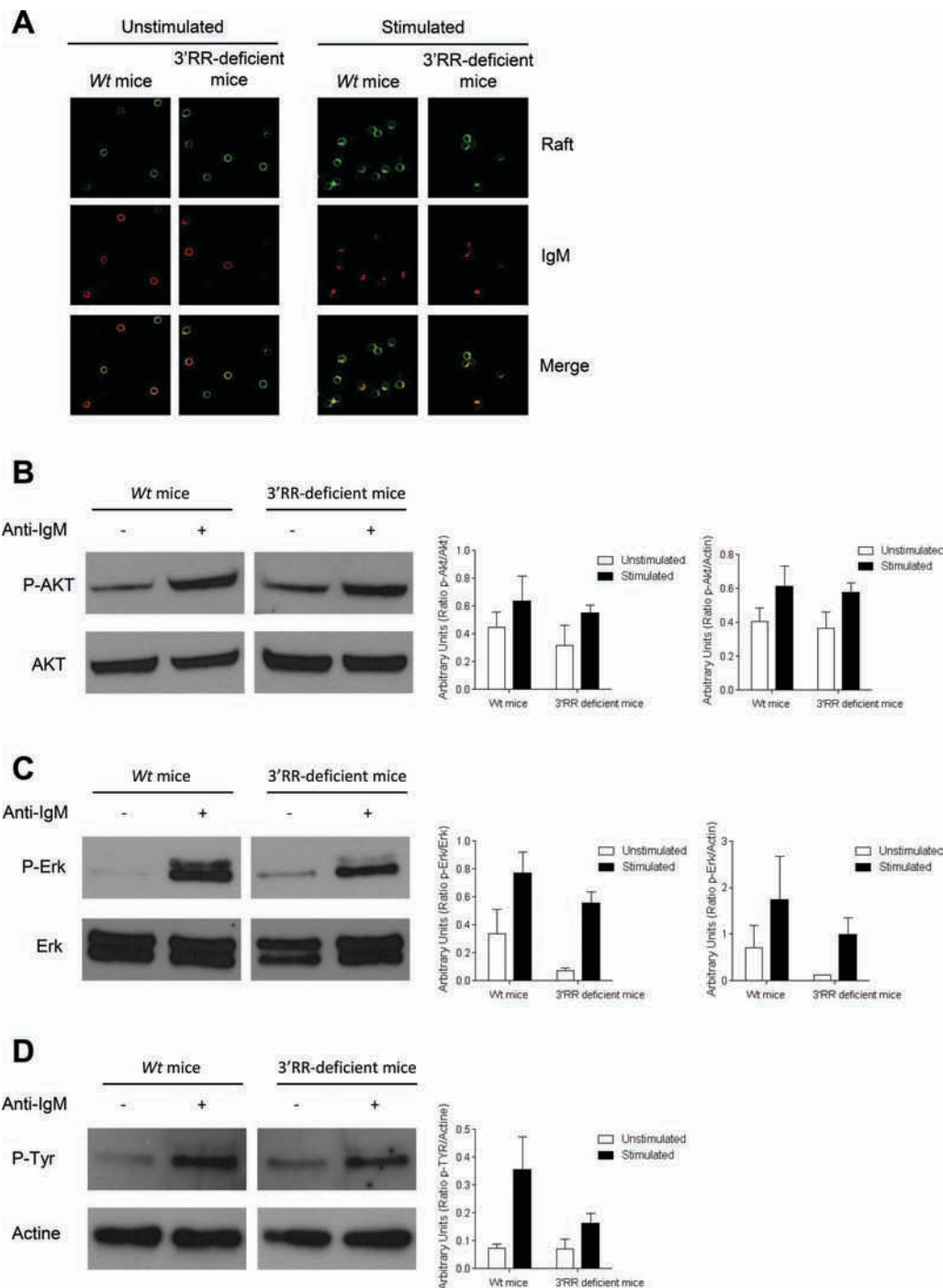


Figure 4: BCR signalling response in 3'RR-deficient B splenocytes. (A) BCR and lipid rafts colocalization experiments. 3'RR deficient mice ($a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) and Sv/129 wt mice (a^{wt}/a^{wt}) were investigated. CD43⁺ B cells were stained with cholera toxin Alexa 488 followed by stimulation with anti-IgM Alexa 594 labelled antibodies. Arrows point to areas where lipid rafts colocalise with membrane BCR. One representative experiment out of four is shown. (B) BCR signalling in 3'RR-deficient mice. CD43⁺ splenic B cells (3×10^6 cells/ml) from wt Sv/129 mice (a^{wt}/a^{wt}) and 3'RR-deficient mice ($a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) (were stimulated with 15 μ g/ml of anti-IgM at 37°C for 10 min. Western Blot experiments were performed with 30 μ g of proteins. Actin was used as an internal loading control. phosphor-Akt and Akt were investigated with specific anti-phosphor-Akt and anti-Akt antibodies, respectively. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Akt bands were related to Akt and actin bands (located in D). (C) phosphor-Erk and Erk were investigated with specific anti-phosphor-Erk and anti-Erk antibodies, respectively. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Erk bands were related to Erk and actin bands (located in D). (D) Total phosphor-Tyr was investigated with specific anti-phosphor-Tyr antibodies. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Tyr bands were related to actin bands. No significant differences for p-Akt, Akt, p-Erk, Erk and p-Tyr between 3'RR-deficient mice and wt mice (Mann-Whitney *U*-test).

Beckton Dickinson) and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton Dickinson) [19–21]. Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice generated by crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) with C57BL/6 mice (IgH b^{wt}/b^{wt}) were investigated. Mixed Sv/129 \times C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used as control mice.

Transcript analysis

Bone marrow B220⁺AA4.1⁺IgMa⁺ and B220⁺AA4.1⁺IgMb⁺ cells were sorted with specific anti-B220, anti-IgMa, anti-IgMb and anti-AA4.1 labelled antibodies using a BD FACSaria III. Splenic follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}), marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) and transitional (TR) B cells (B220⁺AA4.1⁺) were sorted with specific anti-B220-, anti-CD21-, anti-CD23 and anti-AA4.1 labelled antibodies. Total RNA was extracted and real time PCR was performed in duplicate by using TaqMan and SYBR assay reagents and analysed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems) [22]. μ membrane forward (in exon μ 4): 5'-TGGAAGCTCCGGAGAGACCTA-3'; μ membrane reverse (in exon μ membrane 1): 5'-TTCCTCCTCAGCATTCACCT-3'. GAPDH was used for normalization of gene expression levels (reference Mm99999915-g1). Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and mixed Sv/129 \times C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used for cell sorting experiments.

Western blot analysis

CD43⁺ B splenocytes (15×10^6) were stimulated with 15 μ g of goat anti-mouse κ (Southern Biotech) for 10 min at 37°C. Cell lysates (30 μ g) were analysed by SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) as previously reported [22, 23]. After blocking, membranes were incubated with anti-phosphor-Tyr (Cell signalling), anti-phosphor-Erk (Cell signalling), anti-Erk (Cell signalling), anti-phosphor-Akt (Cell signalling), anti-Akt (Cell signalling) and anti-actin antibodies (Sigma), and revealed with HRP-labelled goat anti-rabbit Ig (Biorad) by chemoluminescence (ECL plus, Amersham). Results were analysed with the Java-based image processing program ImageJ that can calculate area and pixel value statistics of user-defined selections and intensity thresholded objects. Homozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ and Sv/129 mice (IgH a^{wt}/a^{wt}) were used for western blot experiments.

Lipid raft aggregation

For BCR and lipid raft colocalization experiments, splenic B cells were purified by hypotonic lysis of red blood cells followed by incubation with anti-CD43-coated MicroBeads (Miltenyi Biotec), which bind to all splenic cells except resting mature B cells. B cells were obtained by passing the cells through a negative depletion

column attached to an OctoMACS magnet (Miltenyi Biotec). 1×10^6 CD43⁺ B splenocytes (100 μ l) were stained with 80 ng of cholera toxin B, a marker of lipid rafts, conjugated to Alexa 488 and 20 μ g of goat anti-mouse IgM conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes) for 30 min on ice then 5 min at 37°C for the stimulated conditions. Cells were then fixed with 4% PFA. For non stimulated conditions cells were incubated 30 min with an anti-IgM-PE on ice and analysed with a Zeiss LSM 510 META confocal microscope. Homozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ and Sv/129 mice (IgH a^{wt}/a^{wt}) were used for experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220100601332), Ligue Contre le Cancer de la Corrèze, ANR (Projets Blanc 2011) and "Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud". P. Rouaud has a fellowship from ARC (DOC20130606964). We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

- Henderson A, Calame K. Transcription regulation during B cell development. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:163–200.
- Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110:27–70.
- Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2005; 42:14362–14367.
- Guo C, Yoon HS, Franklin A, Jain S, Ebert A, Cheng HL, Hansen E, Despo O, Bossen C, Vettermann C, Bates JG, Richards N, Myers D, et al. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature.* 2011; 477:424–430.
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, hs4)

- dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010; 116:1895–1898.
6. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med*. 2013; 210:1501–1507.
 7. Niirio H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:945–956.
 8. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:767–777.
 9. Kaminski DA, Stavnezer J. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol*. 2007; 19:545–556.
 10. Marquet M, Garot A, Bender S, Carrion C, Rouaud P, Lecardeur S, Denizot Y, Cogné M, Pinaud E. The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response *in vivo*. *J Immunol*. 2014; 193:1171–1183.
 11. Guglielmi L, Le Bert M, Truffinet V, Cogné M, Denizot Y. Insulators to improve expression of a 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307:466–471.
 12. Rowland SL, DePersis CL, Torres RM, Pelanda R. Ras activation of Erk restores impaired tonic BCR signalling and rescues immature B cell differentiation. *J Exp Med*. 2010; 207:607–621.
 13. Brenner S, Drewel D, Steinbart T, Weisel F, Härtel E, Pötzsch H, Yu P, Mudde GC, Schweizer A, Nitschke L, Winkler TH. A hypomorphic IgH-chain allele affects development of B-cell subsets and favours receptor editing. *EMBO J*. 2011; 30:2705–2718.
 14. Sedwick CA, Altman A. Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. *Sci STKE*. 2002; 122:re2.
 15. Cheng PC, Cherukuri A, Dykstra M, Malapati S, Sproul T, Chen MR, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol*. 2001; 13:107–114.
 16. Peng C, Eckhardt LA. Role of the IgH intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J Immunol*. 2013; 191:4399–4411.
 17. Liu X, Manser T. Antinuclear antigen B cells that down-regulate surface B cell receptor during development to mature, follicular phenotype do not display features of anergy *in vitro*. *J Immunol*. 2005; 174:4505–4515.
 18. Martin F, Kearney JF. Marginal zone B cells. *Nature Rev*. 2002; 2:323–335.
 19. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem*. 2012; 287:8356–8360.
 20. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol*. 2007; 179:6033–6042.
 21. Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol*. 2009; 182:6926–6932.
 22. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget*. 2012; 3:586–593.
 23. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and c-myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol*. 2012; 180:1688–1701.

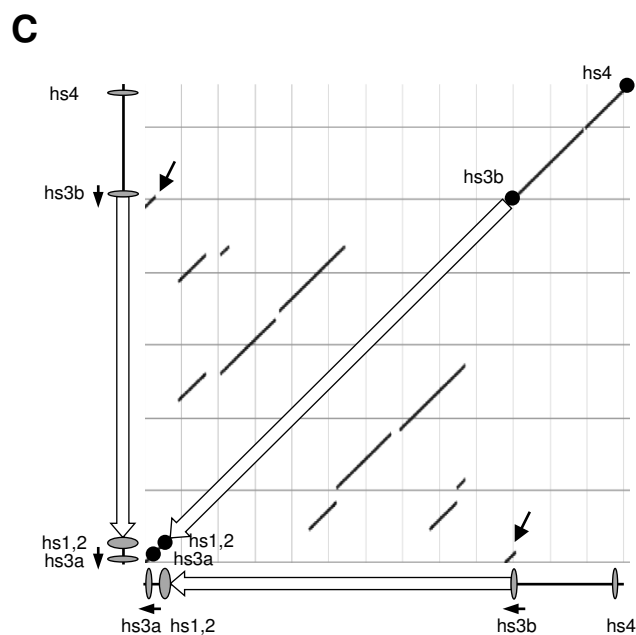
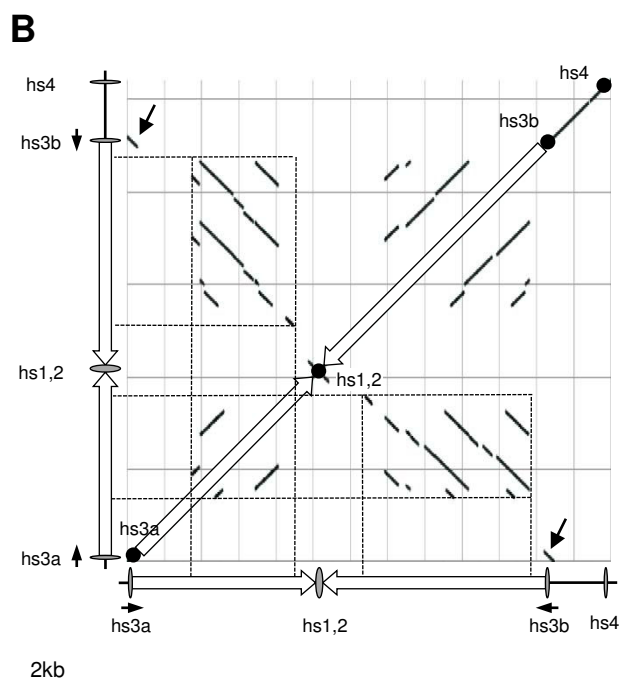
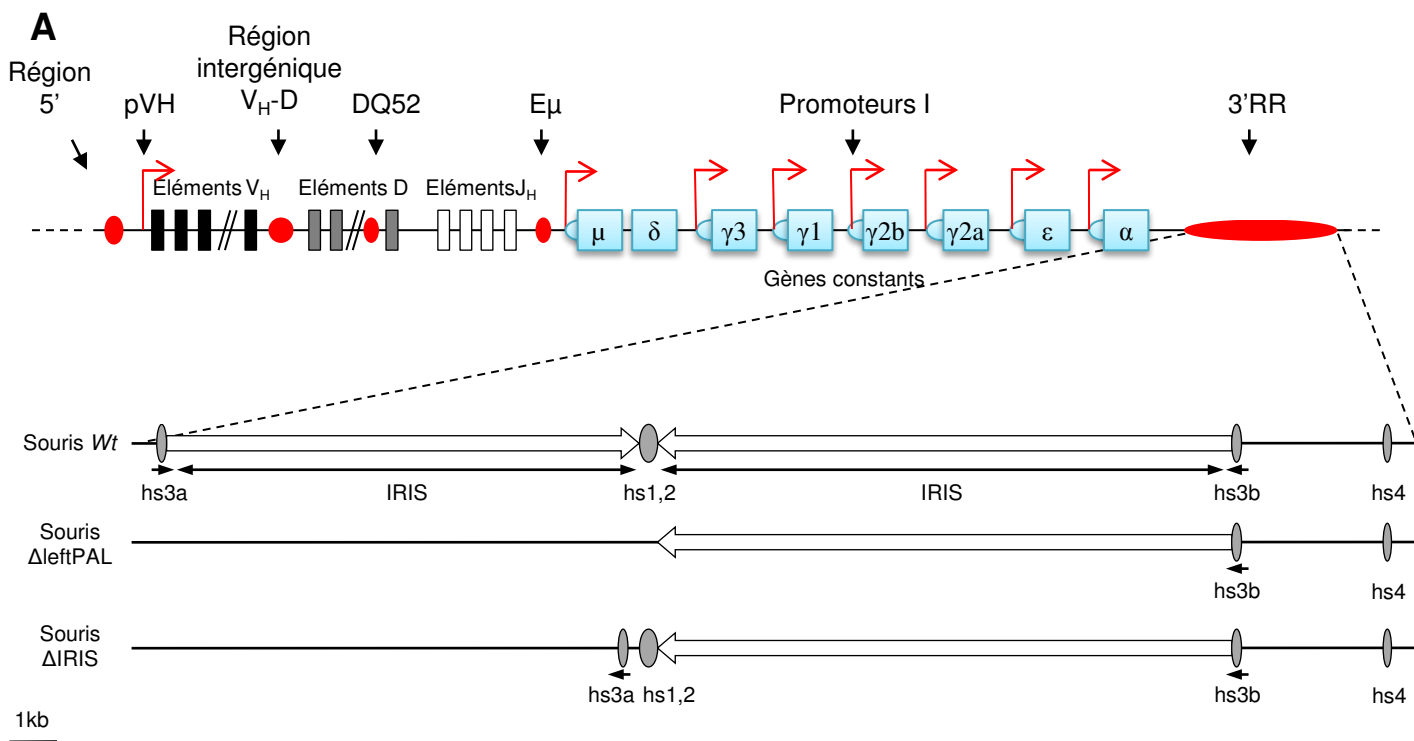


Figure 43 – Représentation schématique des nouveaux modèles murins.

(A) Représentation schématique des modèles ΔleftPAL et ΔIRIS. La comparaison des dot-plots obtenus en alignant les séquences de la 3'RR des souris Wt (B) et ΔIRIS (C) sur elles mêmes montre la disparition totale de la structure palindromique dans ces dernières (visible à la disparition des traits perpendiculaires à la diagonale). Les flèches noires indiquent l'alignement d'hs3a sur hs3b, et inversement.

Article 5

Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region.

Alexis Saintamand, Christelle Vincent-Fabert, Armand Garot, Pauline Rouaud, Zeliha Oruc, Virginie Magnone, Michel Cogné & Yves Denizot.

Nature Communications, 2016, Volume 7, Article numéro 10730.

Si le rôle des différents *enhancers* de la 3'RR est de mieux en mieux connu grâce à l'analyse des différents modèles murins existants, la fonction de la structure palindromique englobant ses trois premiers enhancers reste encore inconnue. Cette architecture caractéristique est très conservée dans l'évolution. Le maintien d'une structure aussi complexe implique une pression de sélection et donc un rôle important dans la régulation de la réponse immune (D'Addabbo et al., 2011).

Pour dissocier le rôle des enhancers de celui de la structure palindromique, nous avons généré deux nouveaux modèles murins (**Fig. 43**) :

- Les souris $\Delta\text{leftPAL}$ portent la délétion des deux premiers *enhancers*.
- Dans les souris ΔIRIS (pour $\Delta\text{Inverted Repeat Intervening Region}$), la séquence séparant *hs3a* et *hs1.2* a été délétée et *hs3a* a été placée en conformation inverse (dans le même sens qu'*hs3b*).

Nous avons analysé ces deux modèles comme celui portant la délétion complète de la 3'RR. Nous avons ainsi recherché d'éventuelles altérations de la SHM, de la CSR, de la transcription germinale des régions constantes, de la répartition des sous populations lymphocytaires B et de la synthèse d'Ig.

L'analyse des sous populations B a été réalisée comme précédemment, à l'aide de souris hétérozygotes $a^{\Delta\text{leftPAL}}/b^{\text{wt}}$ et $a^{\Delta\text{IRIS}}/b^{\text{wt}}$. Les résultats sont identiques dans les deux modèles et n'ont montré ni défaut dans la régulation du *B cell fate*, ni diminution du niveau d'expression de l'IgM membranaire.

L'analyse de la SHM par séquençage haut débit a montré une forte diminution de la fréquence de mutations dans les souris Δ leftPAL (plus de 75% de baisse), et une plus modérée dans les souris Δ IRIS. Des expériences de ChIP ont montré que cette baisse s'explique par un recrutement d'AID moins important. Nous avons analysé l'accessibilité du locus en mesurant la transcription et la fréquence de variants d'histones associés à un état décondensé de la chromatine. Les résultats montrent un profil similaire à celui des fréquences de mutations, avec une baisse plus marquée dans les souris Δ leftPAL que dans les souris Δ IRIS. La délétion des deux premiers enhancers affecte donc fortement la SHM en diminuant l'accessibilité du locus à AID. La présence des deux *enhancers* en absence des séquences IRIS ne suffit pas à restaurer un phénotype normal, indiquant que la structure palindromique est nécessaire au déroulement optimal de la SHM.

Nous avons ensuite analysé la transcription germinale des régions constantes et la CSR. Dans les souris Δ leftPAL, la transcription germinale est diminuée pour $I\gamma 3$ - $C\gamma 3$, $I\gamma 2a$ - $C\gamma 2a$ et $I\gamma 2b$ - $C\gamma 2b$. La CSR montre un profil similaire, avec une diminution du switch vers IgG3, IgG2a et IgG2b. On note également une légère baisse de la CSR vers IgG1, malgré une transcription germinale normale. Le phénotype observé dans les souris Δ IRIS est moins marqué : seule la transcription germinale $I\gamma 2a$ - $C\gamma 2a$ est affectée. Les CSR vers IgG3 et IgG2b sont maintenues à un niveau normal, tandis que les CSR vers IgG1 et IgG2a sont diminuées. Il est intéressant de noter que la transcription germinale $I\alpha$ - $C\alpha$ ainsi que la CSR vers IgA ne sont affectées dans aucun des deux modèles.

Nous avons souhaité analyser l'accessibilité du locus à AID dans les régions constantes. Nous avons donc réalisé des expériences de RNA-seq et de ChIP (H3K4me3 et H3K27ac, deux marques associées à la CSR) sur des splénocytes stimulés *in vitro* pour induire la CSR vers IgG3 et IgG2b. Le RNA-seq a confirmé la baisse de la transcription observée dans les souris Δ leftPAL et le phénotype moins marqué dans les souris Δ IRIS. De même, on observe une baisse des marques H3K4me3 et H3K27ac sur les régions $S\gamma 3$ et $S\gamma 2b$ dans les souris Δ leftPAL, mais pas dans les souris Δ IRIS. Ces résultats suggèrent que la seule présence des quatre *enhancers* est suffisante pour la CSR, de façon plus ou moins indépendante de leur arrangement palindromique.

Nous avons ensuite analysé la capacité des lymphocytes B à sécréter des Ig. La production d'Ig a été mesurée *in vitro*, après stimulation de splénocytes, et *in vivo*. *In vitro*, la sécrétion d'IgG2b, IgG1, IgG2a et IgA est significativement affectée dans les souris

Δ leftPAL. Dans les souris Δ IRIS, seules IgG2b et IgG1 sont diminuées, et de façon plus modérée. *In vivo* on observe une baisse des taux plasmatiques d'IgM, IgG3 et IgG2a dans les deux modèles, la baisse étant cependant plus marquée pour les souris Δ leftPAL. Malgré ces défauts apparents dans la synthèse d'Ig totale, le dosage des Ig spécifiques après immunisation n'a pas montré de diminution significative. Ceci suggère que les cellules B sont capables de compenser l'absence des *enhancers* et de la structure palindromique en réponse à une stimulation antigénique.

En résumé, nos travaux ont démontré que :

- La structure palindromique est indispensable au déroulement optimal de la SHM.
- La CSR dépend principalement de la présence des quatre enhancers, plus ou moins indépendamment du maintien de la structure palindromique.
- La délétion des deux premiers enhancers et/ou la perturbation de la structure palindromique semble diminuer la sécrétion d'Ig total *in vitro* et *in vivo*, mais n'empêche pas la mise en place d'une réaction efficace en réponse à une immunisation.

ARTICLE

Received 21 Aug 2015 | Accepted 15 Jan 2016 | Published 17 Feb 2016

DOI: 10.1038/ncomms10730

OPEN

Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region

Alexis Saintamand¹, Christelle Vincent-Fabert¹, Armand Garot¹, Pauline Rouaud¹, Zeliha Oruc¹, Virginie Magnone², Michel Cogné^{1,3,*} & Yves Denizot^{1,*}

The *IgH* 3' regulatory region (3'RR) controls class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) in B cells. The mouse 3'RR contains four enhancer elements with *hs1,2* flanked by inverted repeated sequences and the centre of a 25-kb palindrome bounded by two *hs3* enhancer inverted copies (*hs3a* and *hs3b*). *hs4* lies downstream of the palindrome. In mammals, evolution maintained this unique palindromic arrangement, suggesting that it is functionally significant. Here we report that deconstructing the palindromic *IgH* 3'RR strongly affects its function even when enhancers are preserved. CSR and *IgH* transcription appear to be poorly dependent on the 3'RR architecture and it is more or less preserved, provided 3'RR enhancers are present. By contrast, a 'palindromic effect' significantly lowers V_H germline transcription, AID recruitment and SHM. In conclusion, this work indicates that the *IgH* 3'RR does not simply pile up enhancer units but also optimally exposes them into a functional architecture of crucial importance.

¹Université de Limoges, CRIBL, UMR CNRS 7276, Limoges 87025, France. ²CNRS et Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097, Sophia Antipolis 06560, France. ³Institut Universitaire de France, Paris 75231, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.D. (email: yves.denizot@unilim.fr).

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA-remodelling events^{1,2}. Multiple *cis*-regulatory elements located 5' and 3' of constant (C) genes control B-cell ontogeny. Among 5' elements, the intronic *E μ* enhancer is reported as a master control element of *V(D)J* recombination^{3,4}. The *IgH* 3' regulatory region (3'RR), which encompasses the four transcriptional enhancers *hs3a*, *hs1,2*, *hs3b* and *hs4*, controls μ -transcription in mature B cells⁵, and is the master element controlling conventional class switch recombination (CSR)^{6,7}, locus suicide recombination⁸ and somatic hypermutation (SHM)⁹ but with little role in *V(D)J* recombination, except for silencing early transcription in pro-B cells^{10–12}. The mouse 3'RR contains four enhancer elements (*hs3a*, *hs1,2*, *hs3b* and *hs4*) with *hs1,2* flanked by inverted repeated intervening sequences (*IRIS*) and the centre of a >25-kb palindrome bounded by 2 inverted copies of the *hs3* enhancers (*hs3a* and *hs3b*) refs 2,13. *hs4* lies downstream of the palindrome. The modest activity of each of the 3'RR elements *in vitro*, however, contributes to a synergic and potent global effect of the 3'RR in transgenes, especially when its 'palindromic' architecture is maintained¹⁴. In humans, each of the two 3'RR located downstream of *C α 1* and *C α 2* contains three enhancer elements similar to mouse *hs3*, *hs1,2* and *hs4*, with *hs1,2* being also flanked by *IRIS*. Beyond divergence of *hs1,2*-flanking sequences, evolution maintained a 'quasi-palindromic' organisation in all mammals for which sequence is available, making it tempting to speculate that this unique arrangement is of significant importance for the regulatory region function¹⁵. To explore the role of the 3'RR palindromic architecture in the context of the endogenous locus, we analysed two newly generated transgenic mice: *hs3a* + *IRIS* + *hs1,2*-deficient mice (called Δ leftPAL mice in this study) lacking the 11.5-kb left half of the 3'RR palindrome (deconstructing palindrome and deleting two enhancer elements) and Δ IRIS mice with the same left-half deletion of the palindrome but with reintroduction of a inverted *hs3a* and *hs1,2* enhancers (deconstructing the palindrome by fully eliminating left-side *IRIS* while maintaining all four core enhancer elements). We report that the deconstruction of the *IgH* 3' palindrome widely affects SHM but only marginally affects CSR, showing that the unique architecture of the *IgH* locus 3' boundary crucially determines the full functional expression of the *IgH* 3'RR transcriptional enhancers.

Results

Generation of Δ leftPAL and Δ IRIS mice. The location of the 3'RR on the *IgH* locus is reported in Fig. 1a. Figure 1b reports the 97% homology between *hs3a* and *hs3b* (in inverse orientation on the chromosome). Dot-plot analysis of the 3'RR DNA fragment encompassing *hs3a* to *hs4* reveals locations of tandem repeats and inverted sequences defining the 3'RR palindromic structure (Fig. 1c). Inversion of *hs3a* and deletion of intervening sequences between *hs3a* and *hs1,2* in Δ IRIS mice totally disrupt the palindromic structure, while maintaining the presence of all 3'RR enhancers. The ES14 cell line was used to generate Δ leftPAL and Δ IRIS mice. The gene-targeting vector replaced the 11.5-kb genomic fragment encompassing the *IRIS* and *hs3a/hs1,2* enhancers with a floxed *neo^R* cassette (Δ leftPAL mutation; Supplementary Fig. 1). Specific 5' and 3' PCR allowed the selection of 8 out of 984 clones. Another gene-targeting vector replaced the genomic fragment encompassing the *IRIS* and *hs3a/hs1,2* enhancers with a cassette including an inverted copy of *hs3a* plus *hs1,2* enhancer and a floxed *neo^R* cassette (Δ IRIS mutation; Supplementary Fig. 1). Inserting *hs3a* in inverted orientation allowed us to completely suppress any dyad symmetry around *hs1,2* without deleting any enhancer sequence (Fig. 1c,d).

Specific 5' and 3' PCR allowed the selection of 6 out of 536 clones. After germline transmission, breeding with cre-expressing mice allowed the derivation of Δ leftPAL and Δ IRIS mice after cre-deletion of *neo^R* (Supplementary Fig. 1).

The palindromic arrangement of 3'RR enhancers influences SHM.

Interactions with cognate antigens recruit activated B cells into germinal centres where they undergo SHM in *V(D)J* exons for the generation of high-affinity antibodies. SHM is strongly altered in the *IgH* locus of 3'RR-deficient mice, whereas SHM in light-chain loci remains unaltered⁹. We explored Δ leftPAL and Δ IRIS mice for potential SHM defects. Mice were daily immunised orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 μ g of LPS for 3 days. This immunisation protocol was found to be most efficient to regularly obtain *in vivo*-activated B cells in Peyer's patches⁸. Mature germinal centre B cells have a B220⁺Fas⁺GL7⁺ phenotype during normal immune responses to T-dependent antigens¹⁶. B220⁺GL7⁺Fas⁺ cells were sorted from immunised wild-type (*wt*), Δ leftPAL and Δ IRIS mice. Extracted DNA was amplified by PCR and submitted to high-throughput sequencing to evaluate SHM. As SHM in light chains is not under the 3'RR control⁹, *IgH* SHM values along rearranged *J_{H4}* sequences were normalised to *J κ 5* SHM values. Mutation frequencies of 1.45% and 0.07% were found in *wt* and AID^{-/-} mice, respectively. SHM frequency was markedly reduced (by more than fourfold, at 0.33%) in Δ leftPAL mice (Fig. 2a,b). The presence of *hs3a* and *hs1,2* enhancers in Δ IRIS mice maintained SHM frequency at 0.75%, that is, at an intermediate level higher than Δ leftPAL mice (Fig. 2a,b) but markedly lower (by about twofold) than in *wt* mice (Fig. 2a,b). Mutations were found all along the analysed 3'*J_{H4}* DNA segment, but hotspots of mutations were evidenced in both genotypes. The proportion of transitions and transversions did not significantly differ between *wt*, Δ leftPAL and Δ IRIS mice (Fig. 2c). An increased percentage of non-mutated sequences was found in Δ leftPAL (18.9%) and Δ IRIS mice (29.1%) compared with *wt* mice (9.3%; Fig. 2d). When comparing the frequency of mutations per sequence, a much lower frequency of sequences carrying multiple mutations (>10 mutations) was found in Δ leftPAL (3.1%) and Δ IRIS (1.8%) mice compared with *wt* mice (25.5%; Fig. 2d). Thus, the palindromic structure of the 3'RR is instrumental for SHM of rearranged *V(D)J* regions, and maintaining *hs3a* and *hs1,2* enhancers in Δ IRIS mice is not sufficient to preserve SHM at the *wt* level.

The 3'RR palindrome influences AID recruitment. We next investigated the mechanism underlying the SHM alteration. SHM correlates with transcription¹⁷. The partial *IgH* transcription defect observed in *hs3b/hs4*-deficient mouse resting B cells did not lead to any significant SHM decrease in germinal centre B cells¹⁸. The situation is quite different in 3'RR-deficient mice, in which a partial *IgH* transcription defect was again observed, but then it was associated with a nearly complete *V(D)J* SHM blockade in activated germinal centre B cells⁹. In the present study, *IgH* primary transcription (location of the probe is shown in Fig. 3a) is maintained at fairly high levels in germinal centre B cells of Δ leftPAL mice and even slightly higher in Δ IRIS mice, thus clearly uncoupling the SHM defect from any major *V(D)J* transcription defect (Fig. 3b). As positive controls, no alteration was found for *Ig κ* transcripts (nor for AID transcripts) in Δ leftPAL and Δ IRIS mice (Fig. 3b). Together with transcription, modified histones, characteristic of active chromatin, constitute hallmarks of the accessibility to SHM factors. ChIP experiments (probes located are shown in Fig. 3a) indicated that trimethylation of lysine 4 in histone H3 (H3K4me3) was

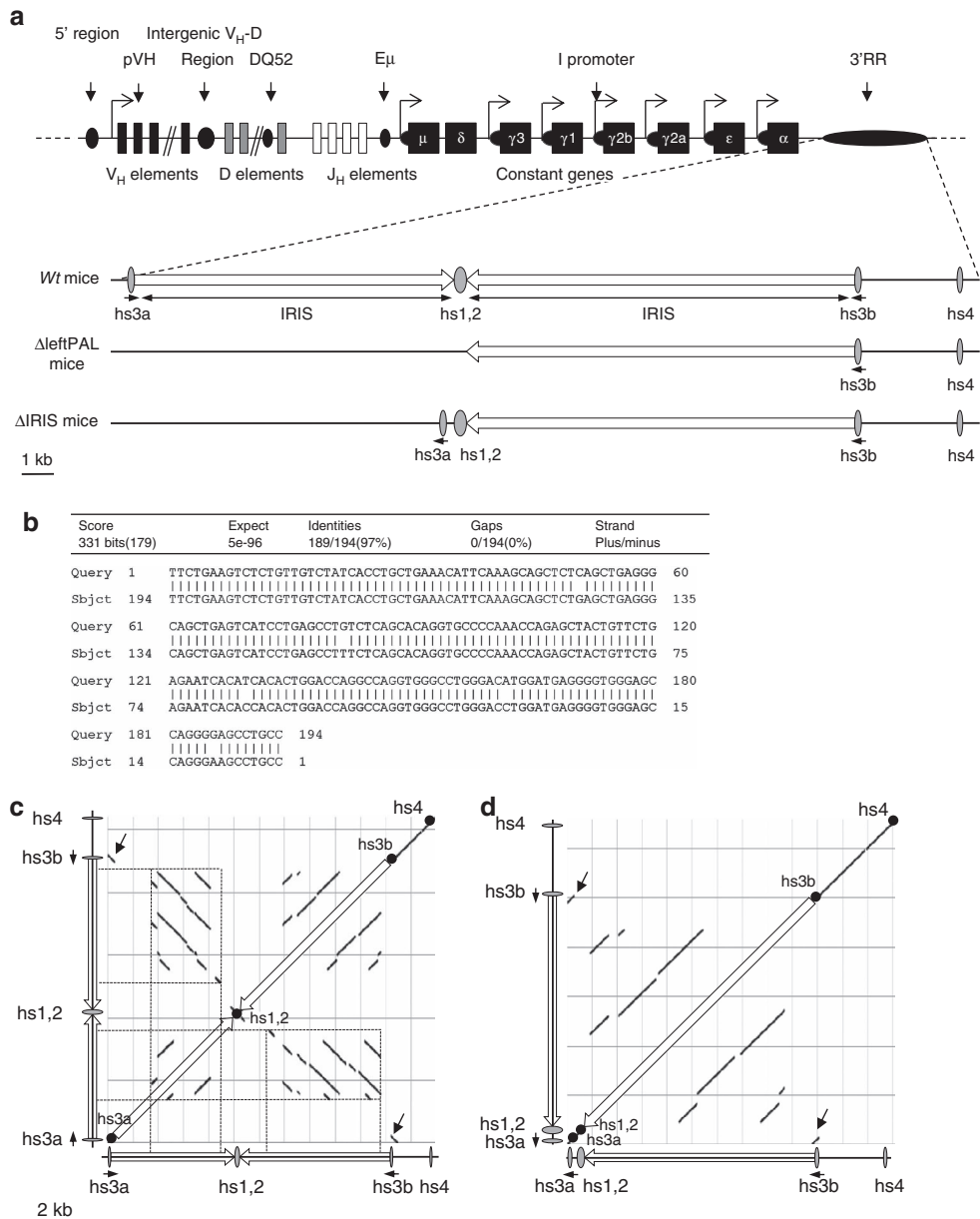


Figure 1 | Palindromic structure of the *IgH* 3'RR. (a) Upper part: The mouse *IgH* locus (not on the scale). Lower part: The 3'RR with its four enhancer elements and the *IRIS* (on the scale). Δ leftPAL and Δ IRIS mice are represented. (b) Sequence and homology between *hs3a* and *hs3b* enhancers (in opposite orientation in the chromosome). (c,d) DNA sequence dot-plot of the 3'RR in wt (c) and Δ IRIS mice (d) showing self similarity. The main diagonal represents the sequence alignment with itself. Parallel lines to the main diagonal represent repetitive patterns within the sequence (that is, tandem repeat), whereas perpendicular lines to the main diagonal represent similar but inverted sequences, thus allowing to identify the palindromic structures (dotted lines). The inversion of *hs3a* enhancer (black arrows) and the deletion of the intervening sequences between *hs3a* and *hs1,2* in Δ IRIS mice totally disrupts the palindromic structure, despite the presence of all enhancer elements.

markedly decreased in activated Peyer's patch cells of Δ leftPAL mice but partially preserved in Δ IRIS mice (Fig. 3c). This shows a synergistic role of enhancers and of the palindromic architecture for induction of epigenetic modifications and chromatin accessibility. Stalling of RNA pol II onto the *IgH* V region is required for AID recruitment during SHM in germinal centre B cells. As shown in Fig. 3d, paused RNA pol II loading was markedly reduced in activated Peyer's patch cells of Δ leftPAL mice and almost normal in Δ IRIS mice. In contrast, AID recruitment is strongly affected in both Δ leftPAL and Δ IRIS mice compared with wt mice (Fig. 3e). Our data thus suggest that the 3'RR palindrome strongly contributes to the efficient recruitment of AID onto the V(D)J region during SHM.

The 3'RR palindrome weakly influences germline transcription. Germline transcription (GLT) of *C_H* gene is a known prerequisite of CSR. We evaluated GLT using real-time PCR on LPS only (*I_{γ3}-C_{γ3}*, *I_{γ2b}-C_{γ2b}*), LPS plus IL-4 (*I_{γ1}-C_{γ1}*), LPS plus TGFβ- (*I_α-C_α*) and LPS plus INFγ- (*I_{γ2a}-C_{γ2a}*) activated splenic B cells from wt, Δ leftPAL and Δ IRIS mice. As shown in Fig. 4a, GLT was heterogeneously affected in Δ leftPAL mice, more or less for *I_{γ3}-C_{γ3}*, *I_{γ2a}-C_{γ2a}* and *I_{γ2b}-C_{γ2b}*, whereas *I_α-C_α* and *I_{γ1}-C_{γ1}* were preserved. Alterations were milder and restricted to *I_{γ2a}-C_{γ2a}* GLT in Δ IRIS mice (Fig. 4a). These data identify GLT as a basic activity of 3'RR transcriptional enhancers that can arise almost independently from their inclusion into the 3'RR palindrome. Accordingly, combined deletion of *hs3b* + *hs4* elements, although minimally

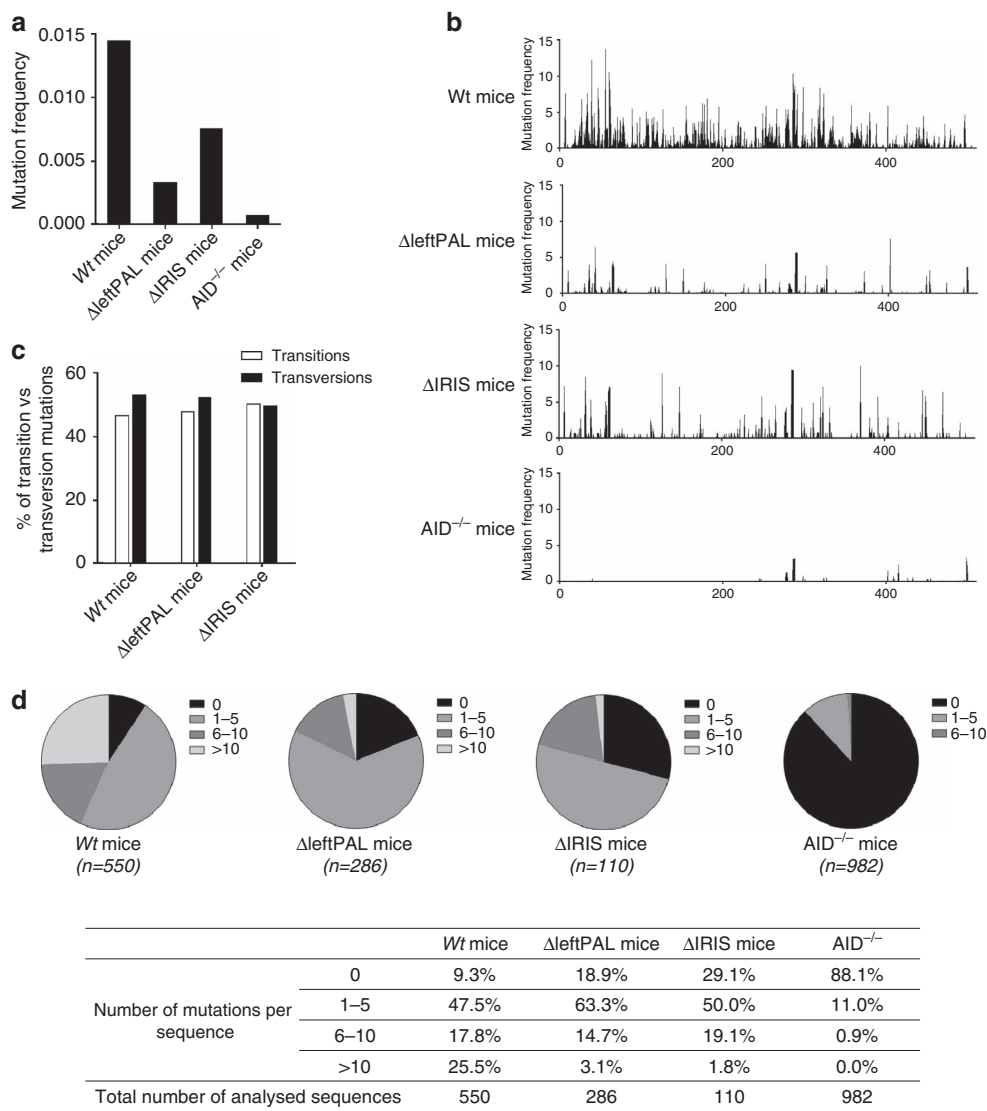


Figure 2 | Influence of the 3'RR palindrome on SHM. (a) SHM in *V_H* regions of ΔleftPAL, ΔIRIS and wt mice. Mice were immunised orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 μg of LPS for 3 days. B220⁺GL7⁺Fas⁺ cells from Peyer's patches were sorted and pooled, and extracted DNA was amplified by PCR and submitted to high-throughput sequencing to evaluate SHM. *V_H* SHM values were normalised to *Jκ5* SHM values. Mean values from six mice for all genotypes were reported (8–12 weeks old, male and female). (b) SHM were found all along the analysed 3'*J_{H4}* DNA segment and hot spot of mutations were evidenced in both genotypes. Same mice as in a. (c) The proportion of transitions and transversions did not significantly differ between wt, ΔleftPAL and ΔIRIS mice. Same mice as in a. (d) Percentages of sequences with 0, 1–5, 6–10 and >10 mutations. (n): number of analysed sequences. Same mice as in a.

truncating the 3'RR palindrome, had a marked role in GLT¹⁹. It also has to be acknowledged that the various *C* genes are not equally affected by 3'RR defects and that *C_{γ1}* GLT was only affected by the whole 3'RR deletion^{6,20}, whereas *C_α* GLT is sensitive to deletions encompassing the *hs4* enhancer element^{6,21}.

The 3'RR palindrome weakly influences CSR. To determine whether results on GLT translated to a decreased CSR, we appreciated by flow cytometry the number of cells switching to a particular isotype after *in vitro* stimulation. Flow cytometric analysis allowed the counting of cells and the study of surface expression of class-switched isotypes on LPS only, LPS plus IL4-, LPS plus TGFβ- and LPS plus INFγ-activated splenic B cells from wt and ΔleftPAL mice. A pattern almost mirroring the results of GLT (except for γ1) was found (Fig. 4b,c). Lowered CSR was found for IgG₃, IgG_{2a} and IgG_{2b}, but not IgA. CSR towards IgG₁ was slightly reduced despite unchanged GLT. Maintaining the

presence of all enhancer elements in ΔIRIS mice preserved CSR towards IgG₃ and IgG_{2b}, but not IgG_{2a} and IgG₁. IgA CSR was in parallel normal, similar to ΔleftPAL mice. Downstream of GLT, we observed efficient preservation of the *in vitro* IgG₃ and IgG_{2b} CSR when enhancers were maintained. Our data confirm the particular status of γ1 and α isotypes with respect to the 3'RR-dependent regulation of CSR control. IgA CSR is only sensitive to deletion encompassing the *hs4* enhancer element^{6,20}, and recently an enhancer-RNA-expressing element called Inc-RNA-CSR was reported to promote CSR towards α by stimulating activity of the 3'RR via a long-distance interaction with the *hs4* region²¹.

The 3'RR palindrome and chromatin accessibility. Molecular analysis of CSR has shown that the 3'RR notably promotes CSR by acting on its initial steps (GLT and histone modifications)²⁰. Together with DNA transcription, several epigenetic marks involved in the targeting of the CSR machinery to *S* regions

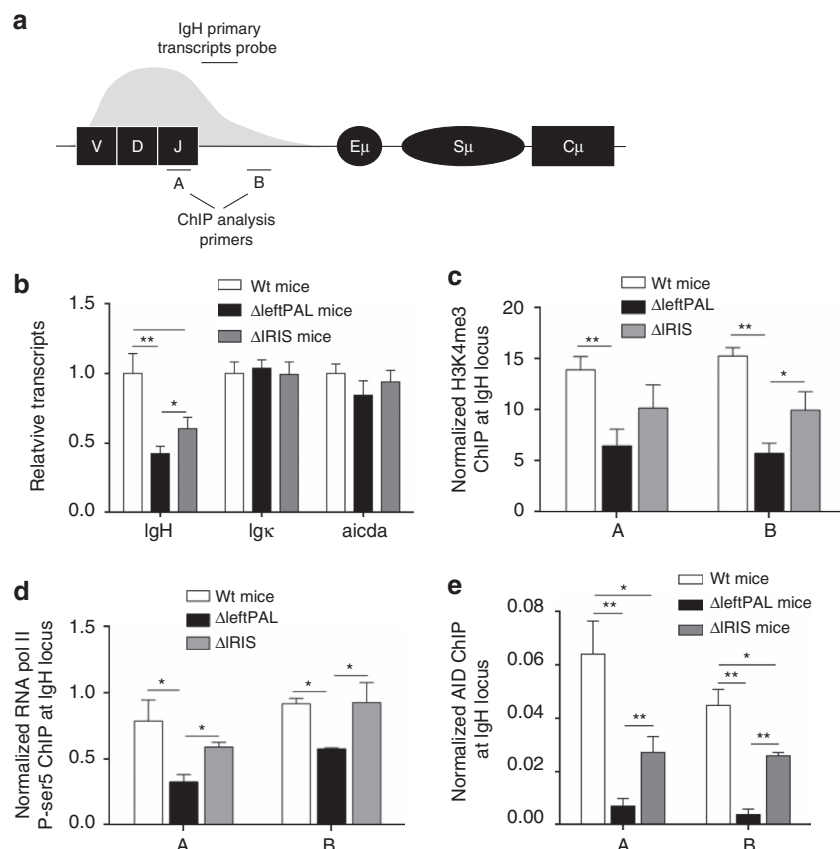


Figure 3 | Mechanism underlying the 3'RR palindromic effect on SHM. (a) Locations of probes (A,B) for ChIP experiments and PCR primers for *IgH* transcription. (b): *IgH*, *Ig κ* and *AICDA* transcription in Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Mice were immunised orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 μ g of LPS for 3 days. Peyer's patch cell RNA was extracted and transcripts were amplified by real-time PCR. Data are the mean \pm s.e.m. of six independent experiments with one mouse per genotype (8–12 weeks old, male and female). * P < 0.05 and ** P < 0.001 (Mann–Whitney's *U*-test for significance). Values were normalised to *GAPDH* transcripts. (c) ChIP analysis of H3K4me3 in V_H regions in Peyer's patch cells in Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Background ChIP signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. ChIP values were normalised to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). * P < 0.05, ** P < 0.01 (Mann–Whitney *U*-test). ChIP experiments were done in A and B locations (as in a). Same immunisation protocol as in b. (d) ChIP analysis of pol II paused in V_H regions in Peyer's patches cells in Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). * P < 0.05, ** P < 0.01 (Mann–Whitney *U*-test). Same immunisation protocol as in b. (e) ChIP analysis of AID recruitment in V_H regions in Peyer's patch cells in Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of five independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). * P < 0.05, ** P < 0.01 (Mann–Whitney *U*-test). Same immunisation protocol as in b.

primed for CSR constitute hallmarks of CSR accessibility^{22,23}. RNAseq experiments showed that *C γ_3* and *C γ_{2b}* transcription (Fig. 5a and d, respectively) was markedly reduced in Δ leftPAL mice compared with wt mice. The presence of *hs3a* and *hs1,2* enhancers in Δ IRIS mice preserved *C γ_3* and *C γ_{2b}* transcription. Levels of H3K4me3 (Fig. 5b,e) and H3K27ac (Fig. 5c,f) in the *I γ_3 -S γ_3 -C γ_3* and *I γ_{2b} -S γ_{2b} -C γ_{2b}* regions (during IgG₃ and IgG_{2b} CSR, respectively) were reduced only on deletion of 3'RR enhancers but preserved in Δ IRIS mice. This suggests that 3'RR effects on CSR mostly rely on the presence of all four 3'RR enhancers, more or less independently from their rigorous palindromic arrangement.

The 3'RR palindrome and B-cell fate. The full deletion of the 3'RR was reported to affect membrane IgM density and to modulate the B-cell fate towards less marginal zone B cells⁵. We generated heterozygous *IgH* a^{Δ leftPAL/*b*^{wt} mice and *IgH* a^{Δ IRIS/*b*^{wt} mice by crossing homozygous Δ leftPAL mice (*IgH* a^{Δ leftPAL/ a^{Δ leftPAL) and Δ IRIS mice (*IgH* a^{Δ IRIS/ a^{Δ IRIS) with C57BL/6 mice (*IgH* *b*^{wt}/*b*^{wt}). Analysis of splenic B cells with IgM-allotype-specific antibodies indicated similar percentages of transitional B cells (B220⁺AA4.1⁺), follicular B cells (B220⁺CD21^{low}

CD23^{high}) and marginal zone B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) expressing either the *a* or *b* allotype in a^{Δ leftPAL/*b*^{wt} and *IgH* a^{Δ IRIS/*b*^{wt} mice (Fig. 6a,b) and no defect in membrane IgM density (Fig. 6c). Percentages of B220⁺CD138⁺ plasmablasts were not different in Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice (Fig. 6d). The lowered IgM density observed in CD138⁺ plasmablasts is almost restored in Δ IRIS mice (Fig. 6e). This again suggests that most of the effects of 3'RR enhancers on IgM expression and relevant B-cell fate are simply provided by the presence of all four 3'RR enhancers, without requiring their rigorous palindromic arrangement.

The 3'RR palindrome and Ig synthesis. Ig production was assessed *in vitro* through stimulation of splenocytes with LPS and/or cytokines. It was significantly affected in both mutant strains of mice, although this phenotype was aggravated in Δ leftPAL mice lacking two enhancers. IgG_{2b} (LPS stimulation), IgG₁ (LPS + IL4 stimulation), IgG_{2a} (LPS + INF γ stimulation) and IgA (LPS + TGF β stimulation) syntheses were markedly reduced in Δ leftPAL compared with wt mice (Fig. 7a). Similar alterations were observed in Δ IRIS mice, except that they were

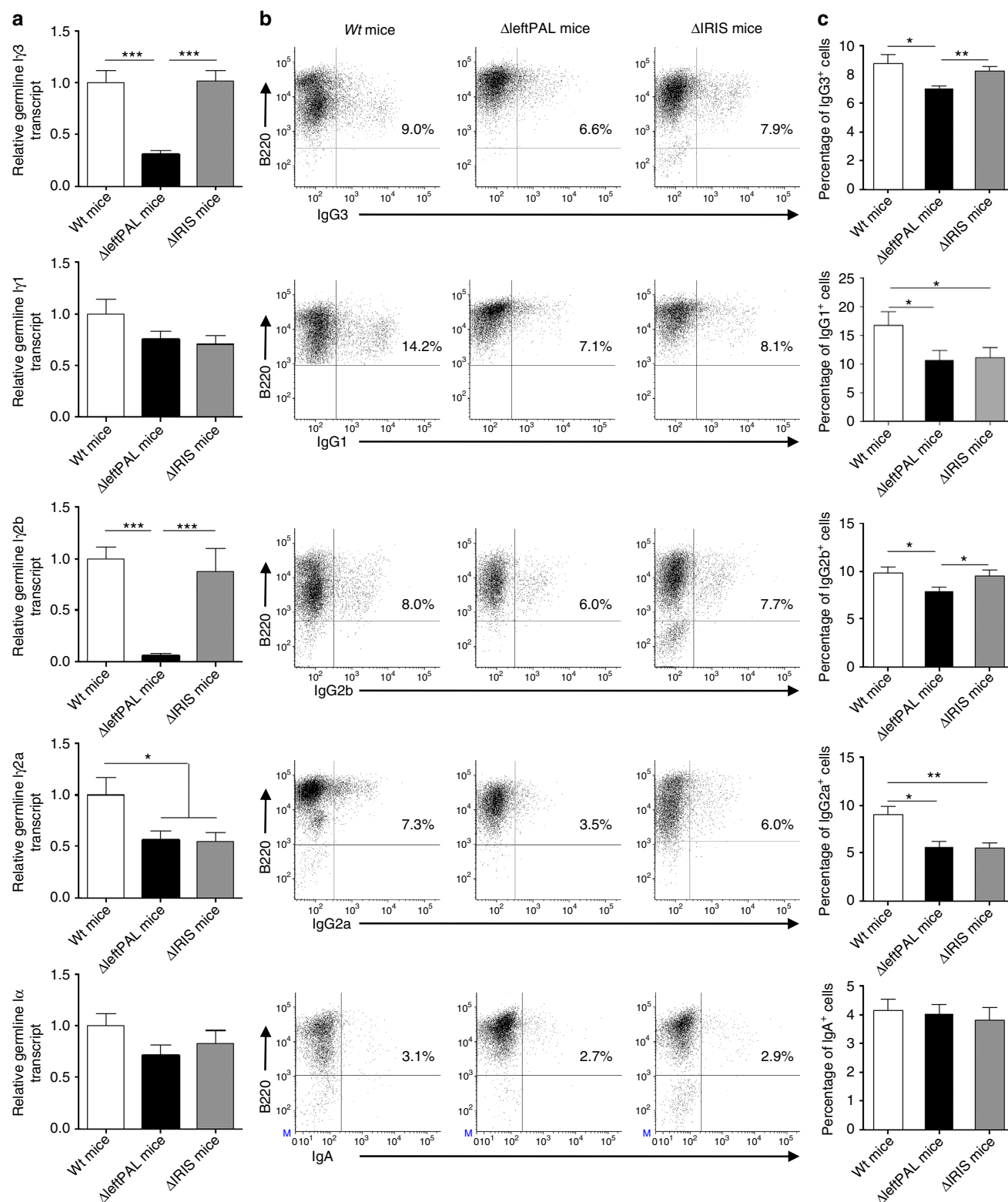


Figure 4 | Influence of the 3'RR palindrome on GLT and CSR. (a) GLT in B splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Cells were stimulated with LPS \pm IL-4, INF γ and TGF β for 2 days. $I\gamma_1$ -C γ_1 , $I\gamma_{2a}$ -C γ_{2a} , $I\gamma_{2b}$ -C γ_{2b} , $I\gamma_3$ -C γ_3 and $I\alpha$ -C α GL transcription was investigated by real-time PCR. Mean \pm s.e.m. of six independent experiments with one mouse (8–12 weeks old, male and female). * P < 0.05 and *** P < 0.0001 (Mann-Whitney U -test for significance). Values were normalised to *GAPDH* transcripts. **(b)** CSR in B splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Cells were stimulated with LPS \pm IL-4, INF γ and TGF β for 3 days. Cells were then labelled with anti-B220-APC antibodies and anti-IgG $_1$ -, anti-IgG $_{2a}$ -, anti-IgG $_{2b}$ -, anti-IgG $_3$ - and anti-IgA-FITC antibodies. One representative experiment out of six (one mouse per experiment) is shown (8- to 12-week-old mice, male and female). **(c)** Mean \pm s.e.m. of six independent experiments of CSR with one mouse (8–12 weeks old, male and female). * P < 0.05 and ** P < 0.001 (Mann-Whitney U -test for significance).

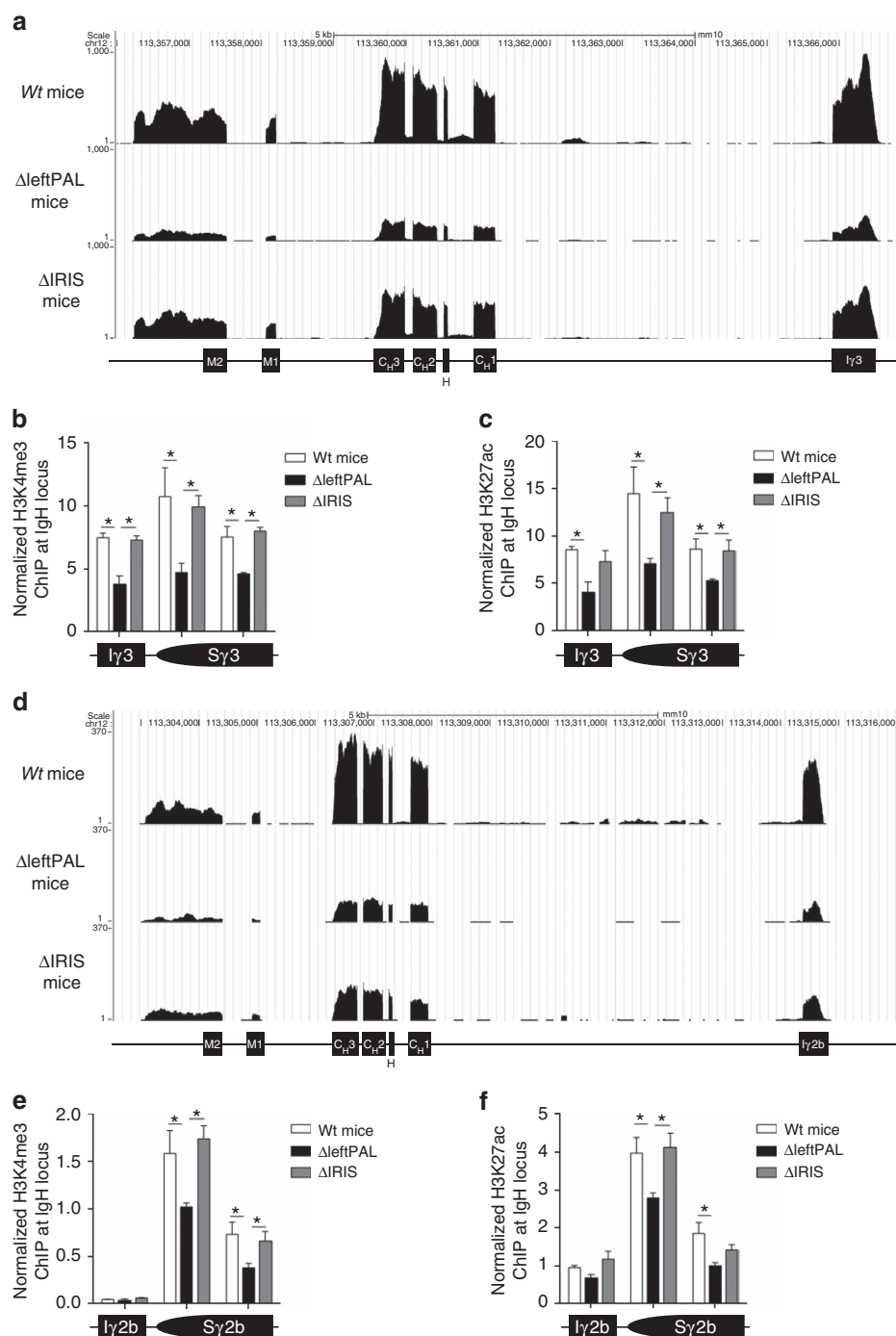


Figure 5 | Influence of the 3'RR palindrome on IgH transcription and activation of epigenetic marks during CSR. (a) $Iy3$ - $Cy3$ transcription in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. CD43-depleted splenocytes were cultured for 2 days with 5 μ g of LPS. RNAseq experiments were performed after depletion of rRNA. Data are the mean of two independent experiments with three mice per genotype (8- to 12-week-old-male mice) (b) ChIP analysis of H3K4me3 in $Iy3$ - $Cy3$ in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). $*P < 0.05$ (Mann-Whitney U-test). (c) ChIP analysis of H3K27ac in $Iy3$ - $Cy3$ in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). $*P < 0.05$ (Mann-Whitney U-test). (d) $Iy2b$ - $Cy2b$ transcription (RNAseq experiments) in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. Same mice as in a. (e) ChIP analysis of H3K4me3 in $Iy2b$ - $Cy2b$ in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). $*P < 0.05$ (Mann-Whitney U-test). (f) ChIP analysis of H3K27ac in $Iy2b$ - $Cy2b$ in $\Delta leftPAL$, $\Delta IRIS$ and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of four independent experiments (8- to 12-week-old mice, male and female). $*P < 0.05$ (Mann-Whitney U-test).

eventually less pronounced and spared IgG₃ and IgA secretion (Fig. 7a). We next investigated Ig production and plasma accumulation *in vivo* and again found similar alterations in both mutant strains, which mostly showed defects for IgM, IgG₃ and

IgG_{2a} plasma levels, whereas IgG₁, IgG_{2b} and IgA were preserved (Fig. 7b). Although statistically significant in both cases, the plasma IgG₃ and IgG_{2a} levels were less markedly decreased in $\Delta IRIS$ mice than in mice with the dual deletion of *hs3b* and *hs4*

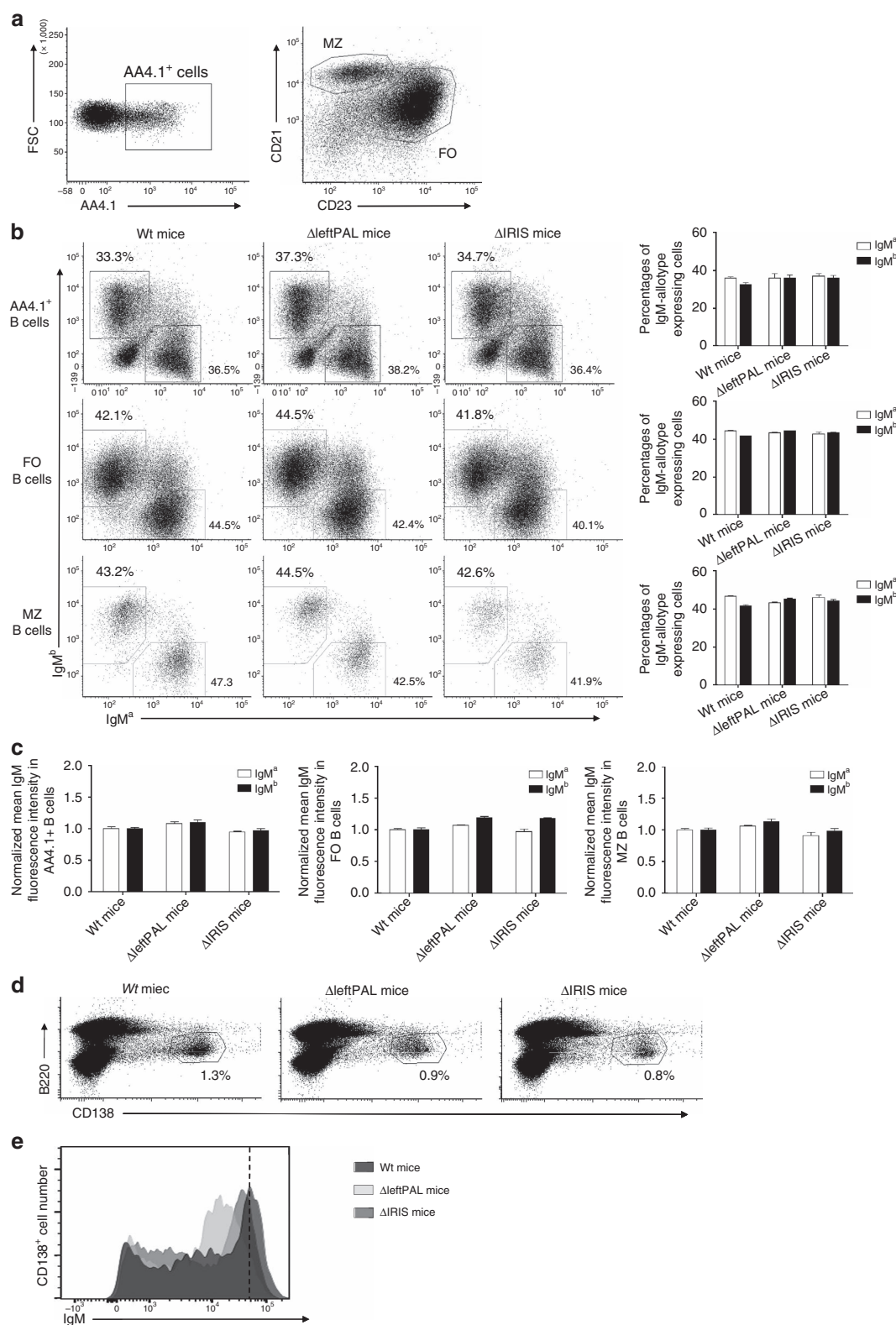


Figure 6 | Influence of the 3'RR palindrome on BCR expression and B-cell fate. (a) Flow cytometry analysis of transitional (TR) B cells (AA4.1⁺), follicular (FO) B cells (CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (CD21^{high}CD23^{low}). One representative experiment out of five is shown (8- to 12-week-old mice, male and female). (b) TR, FO and MZ B cells expressing the *a* or *b* allele in Δ leftPAL/*b*^{wt}, Δ IRIS/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of five is shown (left part). Mean \pm s.e.m. of five mice for all genotypes (right part; 8-12-week-old mice, male and female). (c) Mean \pm s.e.m. of membrane IgM densities on TR, FO and MZ B cells expressing the *a* or *b* allele in Δ leftPAL/*b*^{wt}, Δ IRIS/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice (8-12-week-old mice, male and female). (d) Flow cytometry analysis of plasmablasts (B220⁺ CD138⁺) in spleen of homozygous Δ leftPAL/*b*^{wt}, Δ IRIS/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of three is shown (8- to 12-week-old mice, male and female). (e) Expression of IgM on plasmablasts of homozygous Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. One representative experiment out of three is shown (8- to 12-week-old mice, male and female).

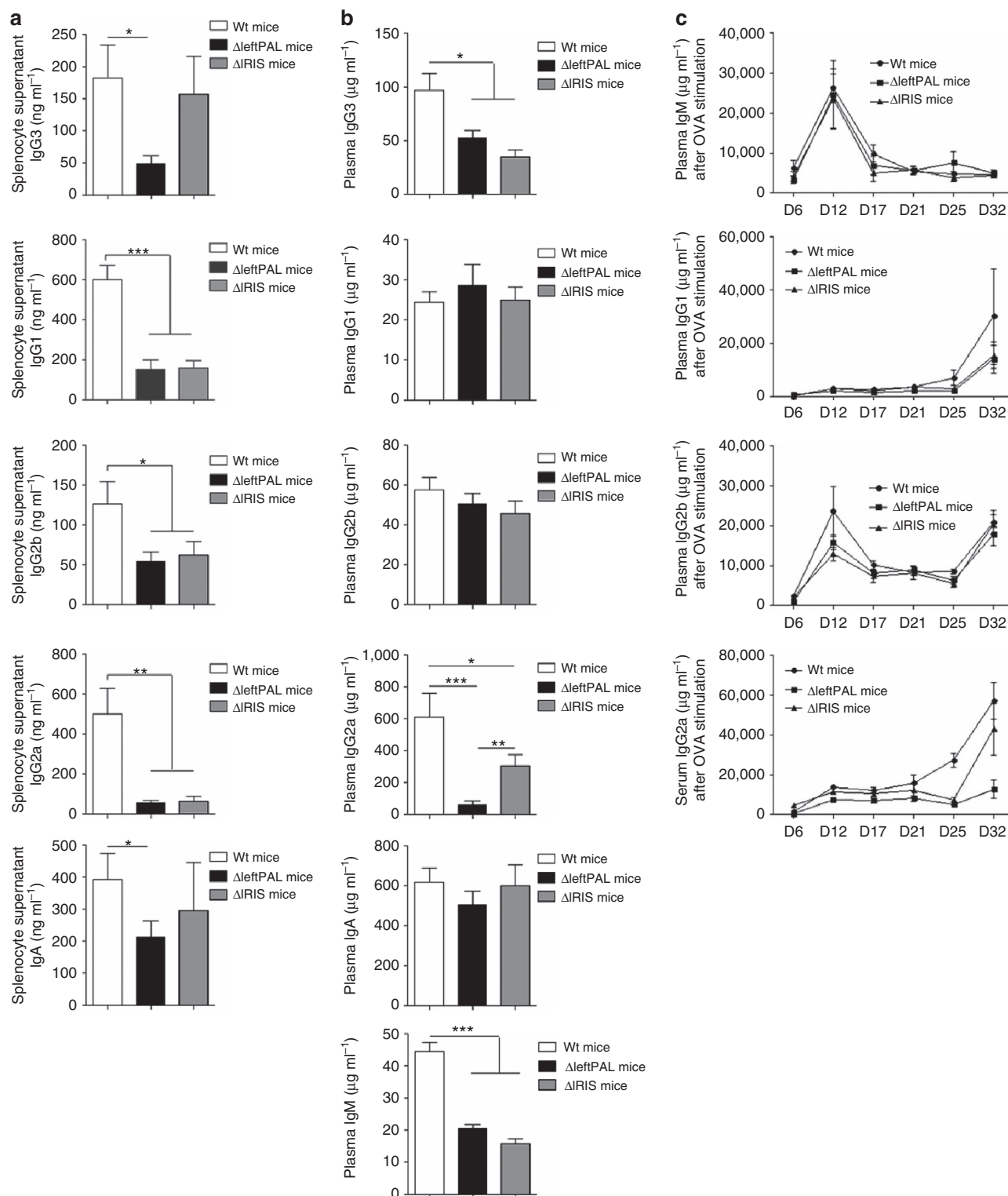


Figure 7 | Influence of the 3'RR palindrome on Ig synthesis. (a) ELISA analysis of IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA in supernatants of LPS \pm IL-4-, INF γ - and TGF β -stimulated splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and wt mice. Data are the mean \pm s.e.m. of eight experiments with one mouse (8–12 weeks old, male and female). * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 (Mann-Whitney U -test for significance). (b) ELISA analysis of IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA in plasma of 10 Δ leftPAL, 9 Δ IRIS mice and 18 wt mice (8 weeks old, male and female). Mean \pm s.e.m. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 (Mann-Whitney U -test for significance). (c) Ovalbumin-specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b}. Antibody levels, detected by ELISA, are expressed in arbitrary units by comparison with control plasma values. Time after immunisation is indicated in days. Each point is the mean \pm s.e.m. of plasma determinations from six mice for each genotype (8–12 weeks old, male and female). One representative experiment out of two is shown.

enhancers¹⁹. Although these total Ig-level defects were clear, evaluation of specific circulating antibody levels after ovalbumin immunisation did not show major alteration, neither in Δ leftPAL nor in Δ IRIS mice, suggesting that the intrinsic B-cell defect was compensated on specific antigenic challenge (with potentially a trend of lower levels of IgG1 and IgG2a antibodies in mutant animals; Fig. 7c).

Discussion

The *IgH* 3'RR is a large and complex *cis*-regulatory region with a unique and striking palindromic architecture (Fig. 1) for which a potential functional role has been long questioned. Because the previously reported focal genomic alterations of the 3'RR could not address the issue of a role for the 3'RR architecture^{6,19,24–27} (Fig. 8), we generated two different mice with complete disruption of the palindromic architecture, either by globally deleting the first-half part of the 3'RR (including *hs3a* and *hs1,2* enhancers) or by removing all inverted repeats while preserving all enhancers (but with *hs3* enhancer disposed as direct repeats) and compared them. SHM in *V_H* genes was markedly affected by the palindromic deconstruction. Keeping *hs3a* and *hs1,2* enhancer intact in Δ IRIS mice prevented the fall in histone modification and RNA pol II pausing but nevertheless affected AID recruitment in *V_H* genes. Taken together, this indicates that, even when all enhancer elements were present, breaking the palindrome symmetry by deleting half of inter-enhancer intervening sequences plus flipping *hs3a* in a direct repeat orientation affected SHM at a level similar to Δ leftPAL mice also lacking *hs3a* and *hs1,2*. Although a role for the non-conserved intervening sequences by themselves cannot be excluded, these

data strongly suggest a role for the palindromic 3'RR architecture during SHM. Indeed, although the absence of any inter-species sequence identity between 3'RR *IRIS* suggests that they do not include major functional motif, conservation of their dyad symmetry architecture around *hs1,2* by contrast suggests an evolutionary pressure on the palindromic structure itself¹⁵. Our data fully support the idea that this pressure on the 3'RR architecture connects with a functional importance for germinal centre B-cell response and thus for optimal humoral immunity. On the basis of previously published data, one can also suggest that the *IgH* 3'RR is somehow split into functional modules. The 25-kb-long palindrome seems to have a strong role in SHM, whereas *hs4* deletion alone only affected membrane IgM expression in resting B cells²⁷, and the *hs3b* + *hs4* deletion affected IgM expression and CSR but not SHM^{18,19}. These data do not formally exclude the hypothesis that the reduction in distances between the enhancers alone accounts for our SHM observation. For other enhancers, dependence on proper spatial organisation and spacing has been reported²⁸. However, we think that data regarding the 3'RR are much more in favour of an architectural role of the repeats, contributing to a given functional secondary or tertiary structure of either the 3'RR and/or the whole *IgH* locus. A contribution of transcription to 3'RR conformation is also suggested by our previous characterisation of 3'RR eRNA⁸, and the recent demonstration that long non-coding RNA coming from distal lncRNA-CSR element positively regulates the activity of the 3'RR (ref. 21).

Combined effect of the four 3'RR enhancers was not sufficient alone for an efficient AID recruitment and thus for a normal SHM rate. Interestingly, a previously reported 3'RR deletion sparing most of its palindromic part but removing its two last

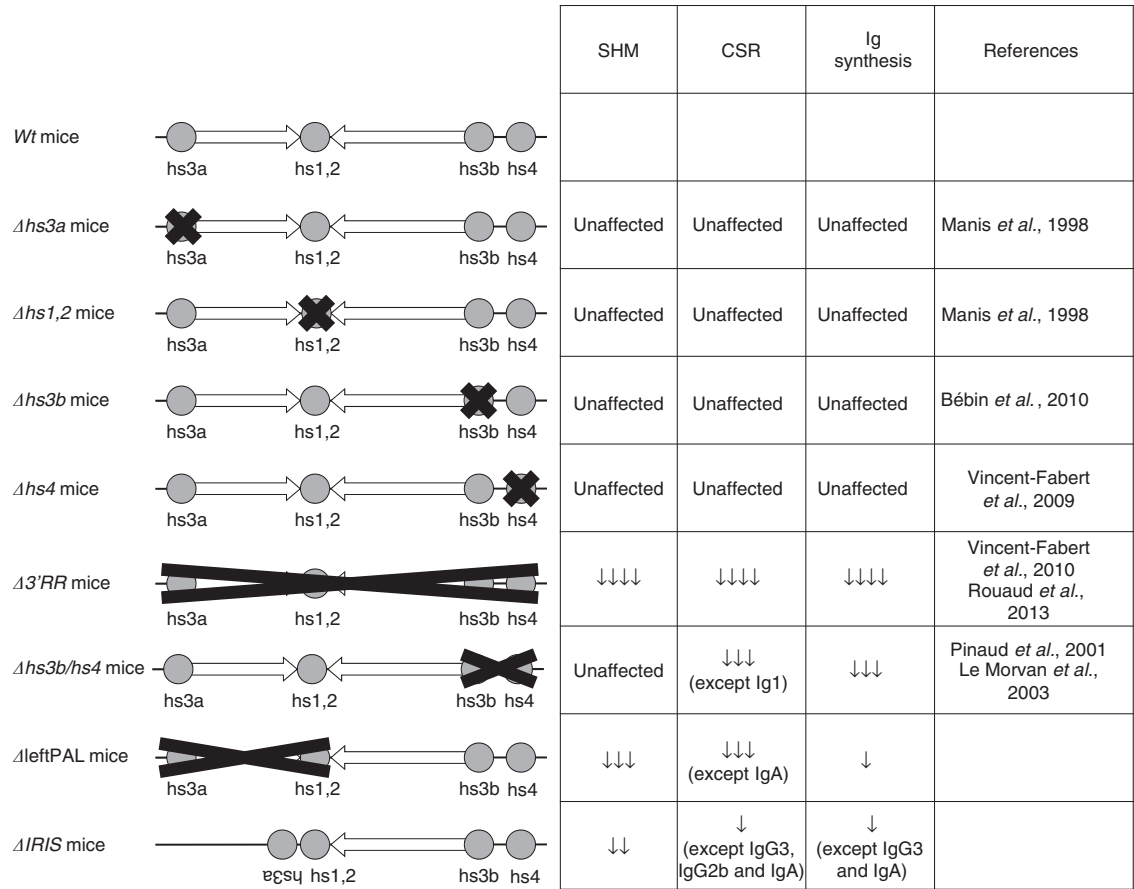


Figure 8 | Mutants of the 3'RR enhancers. References and main results are reported and compared with Δ leftPAL and Δ IRIS mice.

enhancers (*hs3b* + *hs4*) had no effect on SHM¹⁸, but it had major effects on CSR⁹, whereas complete deletion of the 3'RR was shown to simultaneously affect CSR and SHM^{6,9}. In the present study, analysis of Δ leftPAL and Δ IRIS mice with a deconstruction of the 3'RR palindrome only had a minor effect on CSR with reduced CSR towards γ_3 and γ_{2b} connected with decreased γ_3 and γ_{2b} GLT. The 3'RR-induced CSR control is complex, as CSR towards α is mostly dependent on the *hs4* enhancer²¹, and as CSR to γ_1 appears as at least partially 3'RR-independent^{6,20}. These differences probably relate to the specific structures of germline promoters and of S regions, as the number of G-clusters to initiate R loops, the number of WGCW sites for AID deamination and distance to promoter are of key importance for CSR efficiency²⁹. Thereby, S_x has been demonstrated to be able to form R-loops more readily than other isotypes, thus allowing AID to induce the double-strand breaks (DSBs) required to initiate CSR, because of the short distance between I_x and C_x (ref. 30). Transcription is suggested to play a key role both in SHM and CSR. However, the induction of these two processes is different. Although CSR relies mostly on transcription and the repetitive sequences of S regions to produce ssDNA and recruit AID, SHM requires the presence of many co-factors for efficient AID targeting and, thus, may be more dependent on the 3D structure of the 3'RR, which may allow a precise regulation of this mechanism. Moreover, CSR is a 'yes' or 'no' process, which might still be able to occur even when the frequency of AID lesions within downstream S region is decreased (especially in conditions with a 3'RR deletion, where double-strand breaks still occur at high rate in the upstream S_μ region²⁰). In addition, CSR and SHM require the activity of different parts of the AID molecule and different partners of AID, such as 14-3-3 and KAP1/HP1 in the case of CSR³¹. Finally, it has been demonstrated that V and S regions use different mechanisms to expose ssDNA to AID. Although S regions form long R-loops because of to the high level of transcription and their repetitive sequence, V regions display short patches of ssDNA that require the assembly of protein-DNA complex³². AID is, evolutionarily, the first enzyme known to improve immune diversity by SHM, and it is present as early as the primordial jawed vertebrates; AID-induced CSR begins later, with the first amphibians^{32–34}.

In conclusion, SHM requires both 3'RR enhancers and its palindromic architecture, whereas CSR relies mostly on the enhancers, which are sufficient for GLT and accessibility of the locus. Inverted repeats may function by positioning the 3'RR in its optimal 3D configuration, together with eRNA, lncRNA and transcription factor in order to stabilise the chromosomal loops that most efficiently recruit AID downstream of pV_H promoters³⁵. It is of interest to note that CSR and the increased *IgH* transcription occurring at the plasma cell stages do not require these elements, reinforcing the concept that CSR and SHM are mechanistically differently controlled by the 3'RR. Understanding differences of the pathways that contribute to CSR and SHM will help us understand the mechanisms for antibody regulation and diversity. Our present results indicate that the 3'RR regulates AID-induced SHM and CSR by different mechanisms, underline the complexity of action of this major *cis*-regulatory element and demonstrate that not only enhancers included in the 3'RR but also the global palindromic architecture of this region are critical determinants of its function.

Methods

Mice. In all, 129 *wt* mice and C57BL/6 *wt* mice (from Charles Rivers Laboratories, France), as well as Δ leftPAL and Δ IRIS mice (from UMR CNRS 7276, Limoges, France; in a 129 background), were used. Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and has been carried out according to the European guidelines for animal experimentation.

Vector construction and embryonic stem cell screening. A neomycin-resistance gene (*neo^R*) flanked by *loxP* sites was stuck in between 5' and 3' arms. At the 5' end, a phosphoglucokinase promoter-herpes simplex virus thymidine kinase gene (*Tk*) was included to permit negative selection against random integration. Cells of the embryonic stem (ES) cell line E14 were transfected with linearised vector by electroporation and selected using 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ geneticin and 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gancyclovir. The ES cell line E14 was derived from the inbred mouse strain 129. PCR analysis with primers 5' and 3' of the construct identified recombinants. ES clones showing homologous recombination were injected into C57BL/6 blastocysts, and the resulting chimeras were mated with C57BL/6 animals. Germline transmission in heterozygous mutant mice was checked by specific PCR. Mutant mice were mated with cre-transgenic mice. The progeny was checked by PCR for the occurrence of a cre-mediated deletion of the *neo^R* gene. Δ leftPAL and Δ IRIS homozygous mice were checked by PCR. The various PCR primers used for screening the Δ leftPAL and Δ IRIS mice are reported in the Supplementary Table 1 and located in the Supplementary Fig. 1.

Blood sampling. Blood samples were recovered from transgenic mice and *wt* controls with heparinised needles. Ten-week-old animals (male and female) were used. Plasma samples were recovered by centrifugation and stored at -20°C until use.

Spleen cell cultures for CSR and Ig determinations. Single-cell suspensions of CD43[−] spleen cells of *wt*, Δ leftPAL and Δ IRIS mice (8–12 weeks old, male and female) were cultured for 3 days at 1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LPS with or without 20 ng ml^{-1} IL-4, 2 ng ml^{-1} TGF β and 2 ng ml^{-1} INF γ (PeproTech, Rocky Hill, NJ)^{6,36}. At day 3, 1×10^6 cells were cultured for 24 h in growth medium without LPS + cytokine. Supernatants were recovered and stored at -20°C until use. At day 3, cultured splenic B cells were incubated with anti-B220-SpectralRed (PC5)-labelled antibodies (Biolegend, ref: 103212) and anti-IgG₁- (ref: 107020), anti-IgG_{2a}- (ref: 108002), anti-IgG_{2b}- (ref: 109002), anti-IgG₃- (ref: 110002) and anti-IgA- (ref: 104002) fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled antibodies (Southern Biotechnologies), and then analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson)⁶. All antibodies were at a concentration of 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Real-time quantitative PCR of I_x - C_x GL transcription. Three-day *in vitro*-stimulated splenocytes (LPS + appropriated cytokines) were collected and RNA was extracted for investigation of I_x - C_x transcripts. RNA and cDNA were prepared using standard techniques. Quantitative PCR was performed using power SYBR green (Applied Biosystems). PCR primers used for determinations of I_x - C_x transcripts are reported in the Supplementary Table 1.

Immunisation. For immunisation experiments, batches of 8-week-old mice were used (6 mice per genotype, male and female). The first immunisation was performed with 50 μg of chicken ovalbumin per animal in 50% complete Freund's adjuvant and a second immunisation was performed 13 days later with the same amount of antigen in 50% incomplete Freund adjuvant. Immunised mice were eye-bled at various intervals during the immunisation protocol, and plasma was analysed for the presence of ovalbumin-specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} by ELISA¹⁸.

Antibody determinations. Specific ELISAs were performed as follows^{6,18}. ELISAs for specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} were performed in polycarbonate 96-multiwell plates coated overnight at 4°C with 100 μl of 10 mg ml^{-1} ovalbumin solution in 0.05 M Na₂CO₃ buffer. After washing, a blocking step was performed with gelatin (2 mg ml^{-1}) in PBS buffer. After washing, 50 μl of assayed plasma or control plasma was diluted into successive wells (first dilution to 1:50) in gelatin (2 mg ml^{-1}) in PBS buffer and incubated for 2 h at 37°C . The positive control consisted of a pool of plasma from ovalbumin-immunised *wt* mice (the same control plasma was used in all ELISAs). After washing, 100 μl per well of appropriate conjugated antibodies were added and adsorbed for 2 h at 37°C . Alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat antisera specific for mouse IgM (Southern Biotechnologies, ref: 102104), IgG₁ (Southern Biotechnologies, ref: 107004), IgG_{2a} (Southern Biotechnologies, ref: 1080004) and IgG_{2b} (Beckman Coulter, ref: 731943) were used at a concentration of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. After washing, AP activity was assayed using AP substrate, and enzymatic reactions were stopped with 3 M NaOH. The optical density was measured at 400 nm. Diluted plasmas were compared with the titration curve obtained on the same multiwell plate, which allowed the quantification of ovalbumin-specific antibodies in arbitrary units. Culture supernatants and plasma (first dilution to 1:50) from Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice were analysed for the presence of the various Ig classes (IgM, IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2a}, IgG₃ and IgA) by ELISA, as previously described above^{6,18,20}, except for the coating made with suitable capture antibodies (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for IgM (Southern Biotechnologies, ref: 902001), IgG₁ (Southern Biotechnologies, ref: 107001), IgG_{2a} (Southern Biotechnologies, ref: 731956) and IgG_{2b} (Southern Biotechnologies, ref: 731940), 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for IgG₃ (Southern Biotechnologies, ref: 732371) and 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for IgA (Southern Biotechnologies,

ref: 104001), blocking performed with 3% BSA in PBS, AP-conjugated goat antisera specific for mouse IgA (Southern Biotechnologies, ref: 104004) and IgG₃ (Beckman Coulter, ref: 732374), and for standards made with specific antisera for IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA (Southern Biotechnologies)).

ChIP experiments. Mice immunisations were performed orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 µg of LPS for 1 week (8–12 weeks old, male and female). ChIP experiments were done on freshly isolated Peyer's patches cells, as previously described⁸. In brief, 4×10^6 B cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15 ml of PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1 and 167 mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4 °C with 50 ml of 50% protein A/G slurry (0.2 ml ml⁻¹ sheared salmon sperm DNA, 0.5 ml ml⁻¹ BSA and 50% protein A/G; Sigma). In all, 0.1×10^6 cell equivalents were saved as input, and 2×10^6 cell equivalents were incubated overnight with anti-AID or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS, and chromatin was phenol/chloroform extracted. Anti-AID antibodies were kindly provided by Dr P. Gearhart. Anti-H3K4me3 was obtained from Millipore (ref: 07473), and anti-K3K27ac and anti-P-ser5 pol II pause were obtained from Abcam (clone ab4729 and ab5131, respectively). PCR primers are detailed in Supplementary Table 1.

IgH primary transcription analysis. Total RNA was phenol-chloroform-extracted from 5×10^5 B cells from freshly isolated Peyer's patches, in mice previously stimulated, as described above for SHM analysis. Real-time PCR was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents and analysed on a StepOnePlus RT PCR system (Applied Biosystems). IgH primary transcripts (probe located in the intron between the last *J_H* and the intronic *E_H* enhancer) were studied as previously reported³⁷. Forward primer, 5'-TTCTGAGCATTGCAGAC TAATCTTG-3'; reverse primer, 5'-CCTAGACAGTTTATTCCCACTTCTC-3'; and probe, 5'-CCCTGAGGGAGCCG-3'. κ-primary transcripts (probe located in the intron between the last *J_κ* and the intronic enhancer *Ei κ*): κ-forward primer, 5'-ACCCCGCGGTAGCA-3'; κ-reverse primer, 5'-TCCTATCATCTGTGCCTCA GGAA-3'; and probe, 5'-CCCTTGCTCCGCTGGACCA-3'. Aicda transcripts were also analysed (reference Mm01184115-m1) and GAPDH was used for the normalisation of gene expression levels (reference Mm99999915-g1).

Sequencing. Mice were immunised orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 µg of LPS for 3 days. Single-cell suspensions from Peyer's patches were labelled with B220-APC- (Biolegend, ref:103212), GL7-FITC- (Beckton Dickinson, ref: 561530) and Fas-PE- (Beckton Dickinson, ref: 554258) conjugated antibodies. Purification of B220⁺ GL7⁺ Fas⁺ cells was realized on a FACS ARIA III (BD). Genomic DNA was extracted, and a region corresponding to a sequence of 517 bp downstream of the *J_{H4}* segment was amplified by PCR. As a control, Igκ light-chain VJ-rearranged fragments were also amplified. Primers (detailed in the Supplementary Table 1) were coupled to 454 Sequencing adaptor sequences and PCR was performed using the program previously reported⁸. According to the manufacturer, the resulting purified amplicons were prepared for sequencing with a GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A; Roche), and the library of DNA fragments was sequenced on a 454 GS Junior instrument (Roche). Obtained sequences were aligned to the reference sequence using BWA aligner³⁸, and SAMtools software was used to obtain BAM files³⁹. Redundant sequences were excluded, and wig files were generated using IGV Tools⁴⁰ and manually analysed to determine mutation frequencies for each nucleotide in the sequence.

RNAseq experiments. CD43⁺ splenocytes were obtained from 4 wt, 4 ΔleftPAL and 4 ΔIRIS mice before and after 48 h of *in vitro* stimulation (1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum) with 5 µg ml⁻¹ LPS. RNA was extracted using the miRNeasy kit from QIAGEN, according to the manufacturer's instructions. Two pooled RNAs (with two samples) were obtained for each genotype. RNA libraries were obtained using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina), according to the manufacturer's instruction. Libraries were sequenced on a NextSeq500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina). Illumina NextSeq500 paired-end 2×150 -nt reads were mapped with STAR release v2.4.0a versus mm10 with gene model from Ensembl release 77 with default parameters. Quantification of genes was then performed using feature Counts release subread-1.4.6-p1-Linux-x86_64 with '--primary -g gene_name -p -s 1 -M' options based on Ensembl GTF release 77 annotations.

References

- Henderson, A. & Calame, K. Transcription regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 163–200 (1998).
- Pinaud, E. *et al.* The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
- Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. & Pinaud, E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **42**, 14362–14367 (2005).
- Marquet, M. *et al.* The Eμ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response *in vivo*. *J. Immunol.* **193**, 1171–1183 (2014).
- Saintamand, A. *et al.* The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* **6**, 4845–4852 (2015).
- Vincent-Fabert, C. *et al.* Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* **116**, 1895–1898 (2010).
- Rouaud, P. *et al.* Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
- Péron, S. *et al.* AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain 'locus suicide recombination' in B cells. *Science* **336**, 931–934 (2012).
- Rouaud, P. *et al.* The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
- Rouaud, P. *et al.* Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* **287**, 8356–8360 (2012).
- Medvedovic, J. *et al.* Flexible long-range loops in the VH gene region of the IgH locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* **39**, 229–244 (2013).
- Braikia, F. Z. *et al.* A developmental switch in the transcriptional activity of a long-range regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3370–3380 (2015).
- Chauveau, C. & Cogné, M. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* **14**, 15–16 (1996).
- Chauveau, C., Decourt, C. & Cogné, M. Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene* **222**, 279–285 (1998).
- D'addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M. & Frezza, D. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1,2 within the palindrome of IgH 3' regulatory region. *BMC Evol. Biol.* **11**, 71 (2011).
- Kitabatake, M. *et al.* Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.* **189**, 1193–1201 (2012).
- Fukita, Y., Jacobs, H. & Rajewsky, K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* **9**, 105–114 (1998).
- Le Morvan, C., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A. & Cogné, M. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* **102**, 1421–1427 (2003).
- Pinaud, E. *et al.* Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187–199 (2001).
- Saintamand, A. *et al.* Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germ-line deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
- Pefanis, E. *et al.* RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* **161**, 774–789 (2015).
- Stanlie, A., Masatoshi, A., Muramatsu, M., Honjo, T. & Begum, N. A. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 22190–22195 (2010).
- Daniel, J. A. & Nessenzweig, A. Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin class-switch recombination. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 733–738 (2012).
- Cogné, M. *et al.* A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* **77**, 737–747 (1994).
- Manis, J. P. *et al.* Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* **188**, 1421–1431 (1998).
- Bébin, A. G. *et al.* *In vivo* redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* **184**, 3710–3717 (2010).
- Vincent-Fabert, C. *et al.* Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* **182**, 6926–6932 (2009).
- Dickel, D. E., Visel, A. & Pennacchio, L. A. Functional anatomy of distant-acting mammalian enhancers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120359 (2013).
- Zhang, Z. Z. *et al.* The strength of an Ig switch region is determined by its ability to drive R loop formation and its number of WGCW sites. *Cell Rep.* **8**, 557–569 (2014).
- Kato, Y. P. *et al.* Detection and characterization of R-loops at the murine immunoglobulin Sα region. *Mol. Immunol.* **54**, 208–216 (2013).

31. Cogné, M. Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed. J.* **36**, 259–268 (2013).
32. Ronai, D. *et al.* Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* **204**, 181–190 (2007).
33. Laffleur, B. *et al.* AID-induced remodelling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* **5**, 1118–1131 (2014).
34. Kato, L. *et al.* An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. *J. Immunol.* **188**, 3559–3566 (2012).
35. Böhmendorfer, G. & Wierzbicki, A. T. Control of chromatin structure by long noncoding RNA. *Trends. Cell. Biol.* **25**, 623–632 (2015).
36. Truffinet, V. *et al.* The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* **179**, 6033–6042 (2007).
37. Tinguely, A. *et al.* Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 107–117 (2012).
38. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Preprint at <http://arxiv.org/pdf/1303.3997.pdf> (2013).
39. Li, H. *et al.* The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**, 2078–2079 (2009).
40. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze) and 'Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud'. A.S. was supported by a grant from fondation ARC (DOC20150602943). P.R. was supported by a grant from fondation ARC (DOC20130606964). M.C. is supported by Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale. We acknowledge the technological expertise of R. Moulinas and E. Guerin from the GENOLIM platform of the Limoges University (France). This work was developed in close collaboration with the functional genomics platform of Nice Sophia Antipolis, a partner of the National Infrastructure

France Génomique, thanks to support by the Cancéropôle PACA and Commissariat aux Grands Investissements (PB: ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02). We specially thank Pascal Barbry for help and fruitful discussions. We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care. We thank Dr P. Gearhart for providing anti-AID antibodies.

Author contributions

A.S., A.G., P.R., C.V.-F., M.C. and Y.D. actively participated in the experimental design of the study. Z.O. generated transgenic mice. V.M performed the RNAseq experiments. M.C. and Y.D. participated in the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethics committee of our institution to perform the study.

Additional information

Accession codes: The RNA-seq data derived from the CD43[−] splenocytes has been deposited at the GEO under the accession code GSE76359.

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Saintamand, A. *et al.* Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nat. Commun.* **7**:10730 doi: 10.1038/ncomms10730 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Discussion et perspectives

	SHM	CSR	Synthèse d'Ig	Références
<i>Souris Wt</i> 				
<i>Souris Δhs3a</i> 	Non touchée	Non touchée	Non touchée	Manis et al., 1998
<i>Souris Δhs1,2</i> 	Non touchée	Non touchée	Non touchée	Manis et al., 1998
<i>Souris Δhs3b</i> 	Non touchée	Non touchée	Non touchée	Bébin et al., 2010
<i>Souris Δhs4</i> 	Non touchée	Non touchée	Non touchée	Vincent-Fabert et al., 2009
<i>Souris Δhs3b/hs4</i> 	Non touchée	↓↓↓ (except Ig1)	↓↓↓	Pinaud et al., 2001 Le Morvan et al., 2003
<i>Souris Δ3'RR</i> 	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Vincent-Fabert et al., 2010
<i>Souris ΔPAL</i> 	↓↓↓↓	↓↓ (Sauf IgG2b et IgA)	↓↓↓	Annexe 3
<i>Souris ΔleftPAL</i> 	↓↓↓	↓↓ (sauf IgA)	↓	Article 5
<i>Souris ΔIRIS</i> 	↓↓	↓ (Sauf IgG3, IgG2b et IgA)	↓ (Sauf IgG3 et IgA)	Article 5

Figure 44 – Résumé des modèles de délétion de la 3'RR endogène et de leurs phénotypes.
 Les modèles récemment créés et analysés au laboratoire ont permis de préciser le rôle de la 3'RR et de ses différents éléments lors du développement lymphocytaire B.

I) De nouveaux modèles pour étudier la 3'RR

La 3'RR fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte, basées d'abord sur des lignées cellulaires puis sur des modèles *in vivo*. Dès les premiers résultats, une synergie et une redondance d'action entre les différents enhancers ont été mises en évidence. Hs4 agit dès le stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire, tandis qu'hs3a, hs1.2 et hs3b ne semblent agir qu'à partir du stade B mature. Cependant la présence de ces derniers permet de renforcer l'activité d'hs4 lors des stades précoces, même s'ils y semblent inactifs. Des études utilisant des systèmes rapporteurs et la transfection de BAC ont également montré l'implication de la 3'RR dans les mécanismes de diversification secondaire des Ig (Pinaud et al., 2011). Ces modèles d'études restent toutefois assez loin du contexte physiologique et ne reflètent pas nécessairement ce qui a lieu dans le locus IgH endogène.

Pour analyser le rôle des *enhancers* directement dans le locus IgH, la stratégie la plus efficace est l'étude de souris déficientes pour tout ou partie de la 3'RR. Différents modèles ont donc été créés, notamment au sein du laboratoire. En accord avec la redondance entre les enhancers observée précédemment, leur délétion individuelle n'a que peu ou pas d'effets (Manis et al., 1998; Vincent-Fabert et al., 2009a; Bébin et al., 2010). Seule la délétion d'hs4 semble diminuer l'expression d'IgM membranaire. En parallèle, la délétion conjointe d'hs3b et hs4 (souris Δ hs3b/hs4) induit une baisse de la transcription germinale associée à une baisse de la CSR et de la synthèse d'Ig pour tous les isotypes exceptés IgM et IgG1, mais ne semble pas affecter ni la SHM, ni les réarrangements VDJ (Morvan et al., 2003).

Pour mieux comprendre le rôle de la 3'RR, le laboratoire a donc généré et analysé de nouveaux modèles :

- La délétion totale de la 3'RR (souris 3'RR KO), qui a permis de mettre en évidence son rôle dans la SHM, la CSR, la régulation du *B cell fate* et la synthèse d'Ig.
- La délétion des trois premiers enhancers (souris Δ PAL), qui a révélé une forte diminution de la SHM, de la synthèse d'Ig et de la CSR vers tous les isotypes, exceptés IgG2b et IgA. L'article issu de l'analyse de ces souris est présenté en annexe.

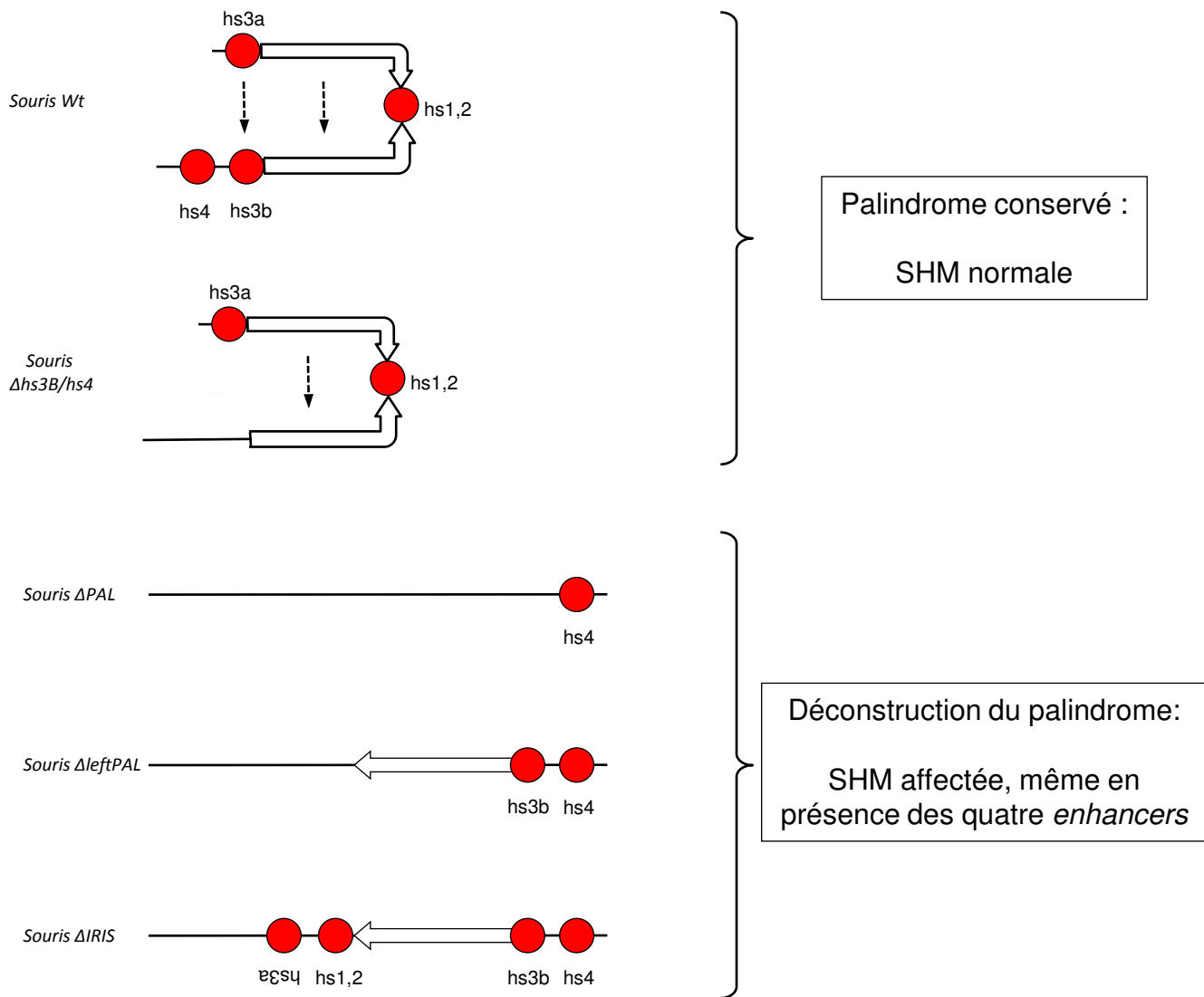


Figure 45 – Perturbation de la structure palindromique de la 3'RR dans les modèles de délétion

Parmi les différents modèles murins existants, seuls ceux qui entraînent une disparition de la structure palindromique de la 3'RR provoquent une diminution de la SHM. Ce phénotype apparaît même lorsque les quatre *enhancers* sont présents, et s'aggrave lors de leur délétion. Il est possible que le palindrome autorise la mise en place de structures particulières de la chromatine facilitant les interactions entre la 3'RR et les séquences cibles de la SHM.

- La délétion des deux premiers enhancers (souris Δ leftPAL), qui a montré une baisse importante de la SHM, et une diminution modérée de la CSR, de la transcription germinale et de la synthèse d'Ig.
- La perturbation de la structure palindromique de la 3'RR (souris Δ IRIS) qui a mis en évidence un léger défaut de SHM et une CSR, transcription germinale et synthèse d'Ig quasiment normale.

Ces modèles ont permis de mieux comprendre le rôle des différents éléments de la 3'RR au cours du développement B et notamment lors de la CSR et de la SHM (**Fig. 44**).

II) La 3'RR lors de la SHM

De manière intéressante, la SHM n'est affectée que dans les modèles présentant une délétion de la partie palindromique de la 3'RR. Ainsi, les souris Δ PAL comme les souris 3'RR KO présentent une disparition quasi-totale de la SHM. La délétion des deux premiers enhancers provoque une diminution de 75% du taux de mutations. La seule suppression de la structure palindromique est suffisante pour perturber la SHM, alors que la délétion combinée d'hs3b et hs4 ne l'affecte pas.

Tous ces résultats suggèrent que seule la partie 5' de la 3'RR est indispensable pour la SHM. Plus particulièrement, on remarque que seuls les modèles perturbant la structure palindromique ont un effet sur ce mécanisme. Il est possible que cette architecture caractéristique autorise la mise en place de structures particulières de la chromatine facilitant l'interaction des enhancers de la 3'RR et des séquences cibles de la SHM (**Fig. 45**).

Dans les modèles 3'RR KO, Δ leftPAL et Δ IRIS, la baisse de la fréquence de mutation est due à une baisse du recrutement d'AID. Deux hypothèses non mutuellement exclusives pourraient expliquer ce phénotype :

- Ce défaut de recrutement pourrait être uniquement du au défaut de transcription, pourtant modéré, observé. Il y aurait donc un niveau « seuil » à atteindre pour que la SHM puisse avoir lieu. Au-delà de ce niveau seuil, la fréquence de mutation serait corrélée au taux de transcription. Cette hypothèse expliquerait la quasi

disparition de la SHM dans les souris 3'RR KO et Δ PAL, et les phénotypes plus modérés dans les modèles Δ leftPAL et Δ IRIS.

- La 3'RR interviendrait directement lors du recrutement d'AID. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'elle soit elle-même une cible d'AID (Péron et al., 2012).

Dans les modèles Δ leftPAL et Δ IRIS, la baisse du recrutement d'AID est corrélée à une diminution de la fréquence de variants d'histones associés à un état décondensé de la chromatine, reflétant une baisse de l'accessibilité des séquences à AID. Cette dernière est liée à l'altération de la transcription. Ces résultats plaident en faveur d'un rôle indirect de la 3'RR sur les régions cibles de la SHM mais n'excluent cependant pas qu'elle agisse directement lors du recrutement d'AID.

III) La 3'RR lors de la CSR

La fréquence de CSR est légèrement diminuée dans les modèles Δ leftPAL et Δ hs3b/hs4. Ce phénotype est aggravé dans les souris Δ PAL, tandis que les souris 3'RR KO présentent une disparition quasi-totale de la CSR : seul un switch résiduel vers IgG1 persiste. En parallèle, les souris Δ IRIS ne présentent qu'une diminution très légère de la CSR vers IgG1 et IgG2a.

Quel que soit le modèle, la diminution de la CSR vers un isotype particulier est accompagnée de la baisse de la transcription germinale associée. Dans les souris 3'RR KO, Δ leftPAL et Δ IRIS, cette baisse est corrélée à une diminution de l'accessibilité de la chromatine à AID. Elle est visible à la diminution de variants d'histones associés à la CSR et à un état décondensé de la chromatine. Dans les 3'RR KO, nous avons également mis en évidence une réduction de la longueur moyenne et de la fréquence de formation des R-Loops nécessaires à la présentation d'ADN simple brin dans les régions *switchs*. Ces résultats suggèrent que la 3'RR contrôle majoritairement la CSR en augmentant la transcription et donc l'accessibilité des régions *switchs*.

Cette hypothèse est appuyée par le faible impact de la perturbation de la structure palindromique sur la CSR, ou encore par le fait que la sévérité du phénotype est corrélée au

nombre d'*enhancers* délétés. La transcription dépendrait essentiellement du nombre d'*enhancers* présents, indépendamment de l'organisation palindromique.

Certains éléments incitent cependant à nuancer cette affirmation. Notamment, la CSR vers IgA semble requérir une régulation particulière. En effet, elle n'est perturbée que dans les modèles présentant une délétion d'hs4 (KO 3'RR et Δ hs3b/hs4). Ainsi, dans le modèle Δ PAL, malgré une sévère altération de la CSR vers la majorité des isotypes, la transcription germinale *Ia-Ca* et le *switch* vers IgA ne sont pas diminués. Ceci suggère que l'IgA est régulée de façon dépendante d'hs4. Un lncRNA a récemment été mis en évidence dans des lignées CH12 comme étant nécessaire à la CSR vers IgA *via* une interaction longue distance avec hs4 (Pefanis et al., 2015). De plus, la proximité du promoteur *Ia* et de la région *Sa* facilitent la formation de R-loops, rendant cette CSR moins sensible à une baisse de la transcription germinale (Roy et al., 2010; Kao et al., 2013). Enfin, une part non négligeable des IgA est sécrétée par des cellules B1, qui *switchent* fréquemment vers IgA en réponse à une stimulation différente de celle induisant cette CSR dans les B2 (Tarlinton et al., 1995; Kaminski and Stavnezer, 2006; Pour revue : Baumgarth, 2011).

L'analyse détaillée du mécanisme par lequel la 3'RR régule la CSR, réalisée sur les souris 3'RR KO, a démontré qu'elle semble agir principalement sur la région acceptrice, afin d'y augmenter l'accessibilité de la chromatine à AID. A l'inverse, la délétion de la 3'RR n'impacte que modérément la transcription et l'accessibilité de la région *S μ* . La transcription à partir d'*I μ* est activée de façon constitutive, tandis que la transcription des régions acceptrices nécessite une stimulation spécifique (Li et al., 1994; Matthews et al., 2014a). Il est possible que la présence d'*E μ* soit suffisante pour maintenir partiellement cette transcription *I μ* en absence de 3'RR, malgré le fait que sa délétion ne perturbe pas la CSR (Marquet et al., 2014).

Les souris présentent une quasi-disparition de la CSR, mais selon un mécanisme différent des souris *AID*^{-/-}. Tandis que ces dernières présentent une absence complète de DSB, notre modèle induit un blocage en cours de CSR, permettant d'étudier les modifications transitoires des cellules lors de ce mécanisme. En effet, les cellules présentent des R-loops et des DSB dans *S μ* , mais ne peuvent réaliser une CSR complète faute de régions acceptrices partenaires et restent donc dans un état "d'attente". Les analyses de transcriptome et d'un panel de miRNA ont mis en évidence une adaptation de la cellule à la présence de DSB, modifiant notamment l'expression de gènes liés à leur prise en charge et leur réparation. Ceci

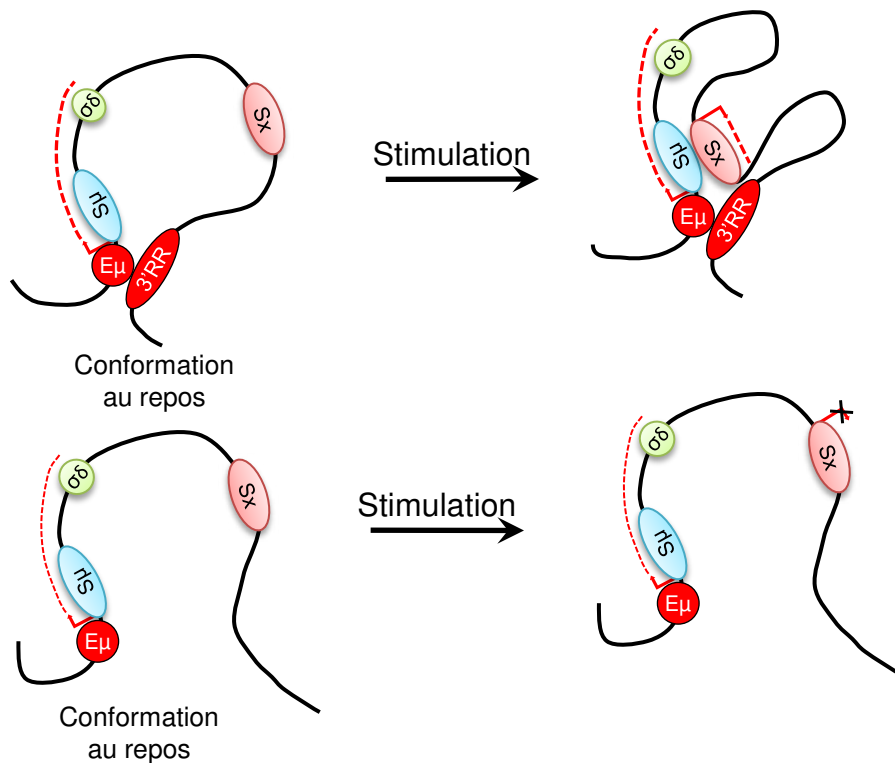
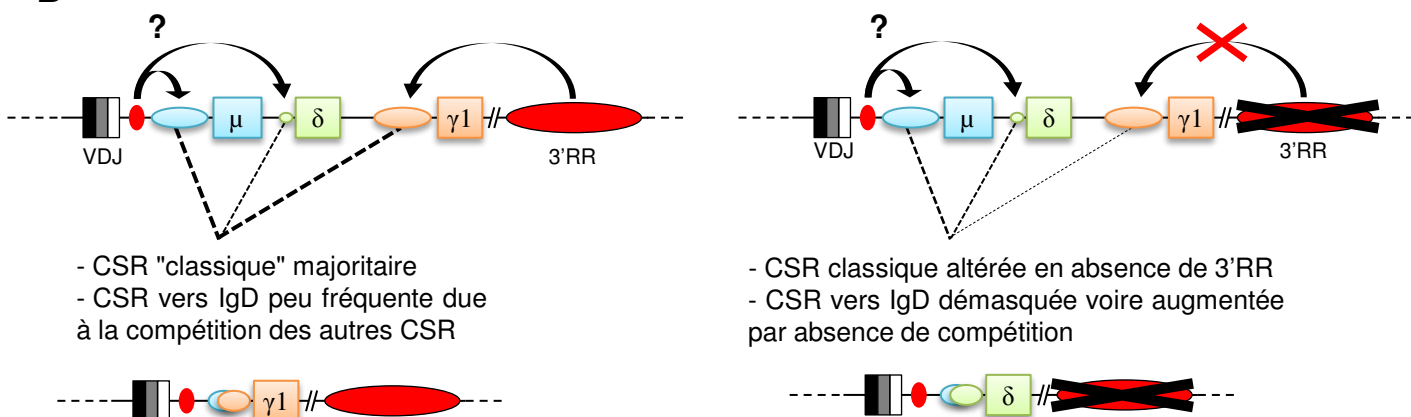
A**B**

Figure 46 – Représentation schématique de la CSR vers IgD dans les souris 3'RR déficientes, en comparaison avec une CSR classique vers IgG1.

La CSR vers IgD est régulée différemment des autres CSR. On remarque notamment l'augmentation de l'usage de la voie de l'AEJ et son indépendance vis-à-vis de la 3'RR. Ces différences pourraient s'expliquer, entre autre, par l'absence de formation de complexes $E\mu/S\mu/Sx/3'RR$, la présence de $S\mu$ et $\sigma\delta$ au sein de la même unité transcriptionnelle (**A**), et par un phénomène de compétition entre la CSR vers IgD et les CSR classiques (**B**). Il est possible qu' $E\mu$ intervienne dans le contrôle de la transcription de $S\mu$ et $\sigma\delta$.

suggère un mécanisme de protection destiné à optimiser la réparation des DSB et ainsi limiter le risque de translocations oncogéniques. De même, nous n'avons pas noté d'accumulation de DSB dans $S\mu$, malgré leur induction à une fréquence relativement élevée et l'absence de réparation par une CSR complète. Ces cassures semblent être réparées par des jonctions *intra-switch*, qui constitueraient alors un mécanisme de secours pour réparer les DSB en absence de régions acceptrices partenaires.

Nous avons également étudié le mécanisme de CSR vers IgD. Nos résultats ont montré plusieurs différences par rapport aux CSR dites "classiques" vers les autres isotypes. On remarque une utilisation plus fréquente de l'AEJ. Plusieurs hypothèses semblent pouvoir expliquer cette différence. Elle pourrait s'expliquer par le ciblage moins important des régions *switchs* par AID lors de la CSR vers IgD que lors des CSR "classiques". En effet, il a été démontré qu'une diminution de la fréquence de déamination favorise l'usage de la voie de l'AEJ au détriment du NHEJ (Cortizas et al., 2013). D'autre part, dans le cas des CSR "classiques", la recombinaison a lieu entre deux séquences éloignées, localisées dans des unités transcriptionnelles distinctes rapprochées lors de la formation d'un complexe $E\mu/S\mu/Sx/3'RR$. A l'inverse, lors de la CSR vers IgD, les séquences sont relativement proches et localisées dans la même unité transcriptionnelle (**Fig. 46A**). Ces différences pourraient contribuer à l'emploi préférentiel de l'AEJ lors de la CSR vers IgD, en opposition aux CSR "classiques" qui favorisent l'emploi du NHEJ.

De manière surprenante, la CSR vers IgD semble être indépendante de la 3'RR, et paraît même augmentée dans les souris 3'RR KO. Il est difficile d'exclure l'hypothèse que cette détection plus fréquente dans notre modèle soit due au fait que cet événement rare soit masqué par les CSR "classiques" chez les souris *Wt*. Cependant, cette augmentation pourrait s'expliquer par la disparition de la compétition des autres CSR (**Fig. 46B**). En présence de la 3'RR, suite à une stimulation induisant la CSR la transcription augmente à partir d' $I\mu$ et $I\alpha$, entraînant l'apparition fréquente de DSB dans les régions *switchs* associées. En parallèle, $\sigma\delta$ est transcrit *via* la transcription initiée par $I\mu$ et/ou le promoteur pV_H (permettant la synthèse d'IgD par épissage alternatif), ce qui permet son ciblage par AID, à une fréquence cependant plus faible que pour les régions $S\mu$ et Sx . Les DSB dans $\sigma\delta$ et dans Sx entrent alors en compétition pour être réparées sur $S\mu$. Il existe un avantage net pour la réparation sur les cassures dans Sx , d'une part grâce à leur fréquence plus élevée et d'autre part grâce aux repliements lors des interactions $E\mu/S\mu/Sx/3'RR$. A l'inverse, en absence de 3'RR la

transcription de Sx et la fréquence de DSB dans les régions Sx diminuent fortement, et les re pliements ne peuvent plus avoir lieu. En revanche $\sigma\delta$ est localisée dans la même unité transcriptionnelle qu'I μ , qui est modérément affectée par la délétion de la 3'RR. Le ciblage de $\sigma\delta$ par AID sera donc moins affecté que pour les régions acceptrices Sx. Les DSB dans $\sigma\delta$ seront alors favorisées lors des recombinaisons avec S μ , expliquant l'augmentation de la CSR vers IgD dans les souris 3'RR KO.

Si le mécanisme de CSR vers IgD est désormais plus clair, il reste encore à déterminer s'il s'agit d'une CSR "accidentelle", due à l'induction de cassures dans une région *switch* résiduelle, ou si elle a lieu en réponse à une stimulation spécifique. L'équipe de Cerutti est parvenue à induire la CSR *in vitro* en stimulant des cellules B par un cocktail de cytokines (IL15, IL21, BAFF et/ou APRIL), s (Chen et al., 2009). Nous n'avons cependant pas réussi à reproduire ces résultats chez la souris, ni à identifier d'autres conditions de stimulation permettant d'induire la CSR *in vitro* comme il est possible de le faire pour les autres isotypes.

Cependant, si les cellules IgM/IgD⁺ ne représentent qu'une faible population à l'état normal, certaines réponses immunitaires entraînent une forte augmentation de leur nombre, notamment dans les amygdales chez l'Homme (Zheng et al., 2004). De plus, une étude a démontré qu'après une infection virale on détecte la présence d'IgD spécifiques du virus dans le sérum de souris, suggérant que l'IgD joue un rôle lors des réponses anti-virales (Moskophidis et al., 1997). Enfin, plusieurs espèces bactériennes sont capables de se lier de façon spécifique à la région constante de l'IgD, entraînant l'activation et la prolifération des lymphocytes B chez l'Homme (Forsgren and Grubb, 1979; Jendholm et al., 2008). Ces interactions ont été particulièrement étudiées pour deux espèces bactériennes : *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae*. Ces bactéries colonisent les voies respiratoires et interagissent donc avec les cellules B des amygdales, où sont justement retrouvées l'essentiel des cellules ayant *switché* vers IgD (Gjörloff Wingren et al., 2002; Jendholm et al., 2008; Singh et al., 2014). Ces données suggèrent donc que les cellules B IgM/IgD⁺ contribuent à la réaction immunitaire en réponse à certaines infections. Ils restent cependant à déterminer si la présence de ces pathogènes induit directement la CSR vers IgD, ou si elle provoque simplement la prolifération de cellules ayant *switché* vers IgD de façon « accidentelle » et les rend plus facilement détectables.

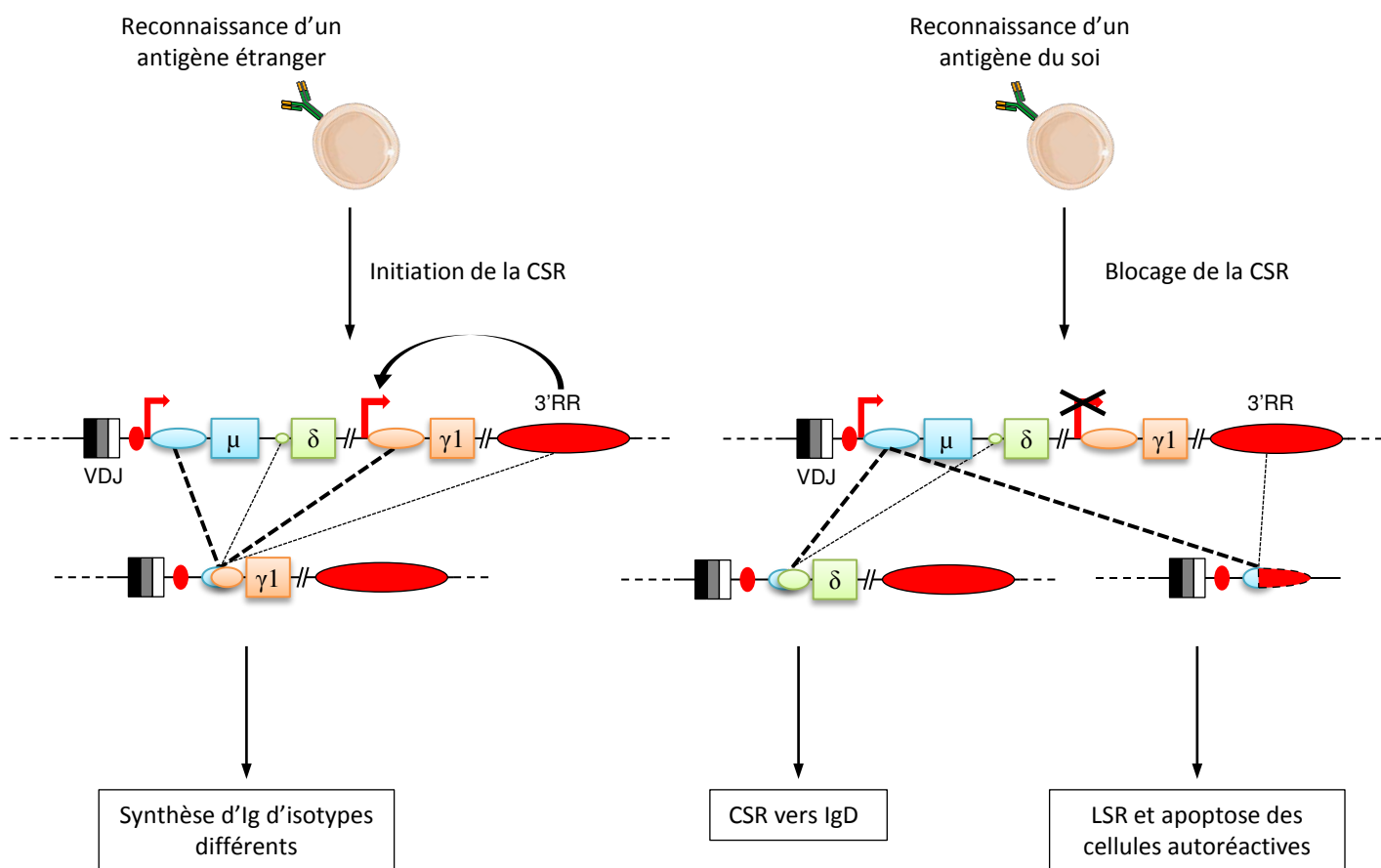


Figure 47 – Hypothèse d'un blocage de la CSR comme mécanisme de protection contre l'autoimmunité.

En réponse à une activation par un antigène étranger et suite à leur passage dans le GC, les cellules B vont pouvoir subir la CSR et générer des anticorps d'isotypes différents. A l'issue de ces recombinaisons, elles pourront se différencier en plasmocytes à longue durée de vie ou en cellules B mémoires. La CSR vers IgD ou la LSR peuvent avoir lieu, mais à des fréquences négligeables par rapport aux CSR classiques.

Lors de la reconnaissance d'un antigène du soi, le blocage de la CSR a été proposé comme mécanisme de protection contre l'autoimmunité (Zheng et al., 2004; Koelsch et al., 2007). En absence de CSR classique, la cellule pourrait alors se transformer en plasmocyte sécréteur d'IgM à courte durée de vie, subir la CSR vers IgD ou réaliser une LSR et entrer en apoptose. Ces mécanismes permettraient d'éviter l'apparition de cellules B autoréactives *switchées* potentiellement dangereuses pour l'organisme.

Il a été démontré chez l'Homme que les Ig des cellules ayant effectué une CSR vers IgD sont très fréquemment autoréactives et/ou polyréactives (Koelsch et al., 2007; Zheng et al., 2004). Les auteurs ont émis deux théories pouvant expliquer cela :

- Le switch vers IgD pourrait avoir lieu dans n'importe quelle cellule B. Une "sélection" aurait alors lieu après la CSR et favoriserait la survie des cellules autoréactives. Cette sélection serait due à la capacité des BCR IgD à transmettre des signaux favorisant la survie cellulaire de façon plus efficace que les IgM (Roes and Rajewsky, 1993; Brink et al., 1994).
- Le *switch* IgD pourrait au contraire être une conséquence de l'autoréactivité des cellules. Il a été suggéré que la présence d'un BCR faiblement autoréactif entraîne l'inhibition des CSR "classiques", mais n'empêche pas la survie de la cellule. Cette tolérance pour les cellules non *switchées* est due au fait que la réponse IgM est généralement moins intense et moins longue que celle impliquant des cellules switchées. De plus, les IgM autoréactifs sont généralement moins délétères que les Ig d'autres isotypes. Suite à l'activation de ces cellules, la CSR vers IgD pourrait avoir lieu en absence de la compétition des CSR "classiques" (Zheng et al., 2004; Koelsch et al., 2007).

Cette dernière hypothèse semble particulièrement intéressante, puisqu'elle est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la CSR vers IgD serait augmentée dans les souris 3'RR KO suite à l'absence de CSR classiques. Ainsi, il existerait un mécanisme de protection qui empêcherait l'activation des régions *switchs* acceptrices des cellules autoréactives, afin d'éviter une CSR qui les rendrait potentiellement plus dangereuses. La région $\sigma\delta$, régulée différemment des régions *switchs* "classiques", échapperait à cette inhibition et permettrait la CSR en réponse à une activation de la cellule B. Il est également possible que ce blocage de la CSR favorise la LSR et entraîne l'apoptose des cellules autoréactives (**Fig. 47**).

IV) Conclusion générale et perspectives

L'analyse de nos modèles murins a donc permis de préciser le rôle de la 3'RR et des différents éléments la composant lors du développement lymphocytaire B. Nous avons

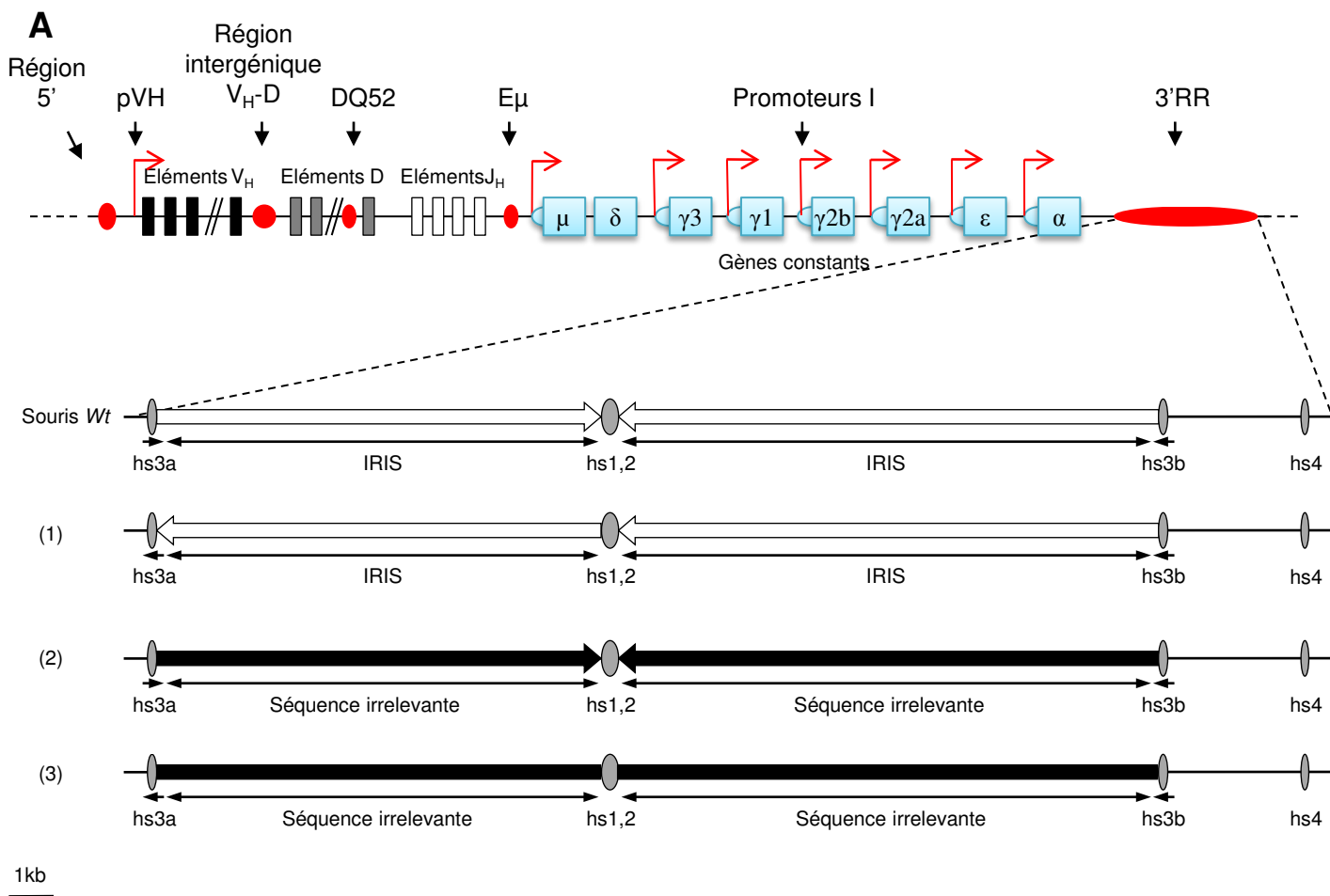


Figure 48 – Représentation schématique de modèles murins qui permettraient l'analyse du rôle des séquences répétées inversées.

- (1) L'inversion d'hs3a et de la séquence située entre hs3a et hs1.2 permettrait de supprimer la structure palindromique tout en conservant la distance entre les *enhancers* et les sites de fixation de facteurs de transcription.
- (2) Le remplacement des séquences IR par des séquences d'ADN irrelevantes en conformation répétées inversées permettrait de conserver la structure palindromique et la distance entre les *enhancers*, tout en éliminant les sites de fixation de facteurs de transcriptions potentiels.
- (3) Enfin, le remplacement des séquences IR par des séquences d'ADN irrelevantes permettrait de conserver la distance entre les *enhancers*, tout en éliminant la structure palindromique et les sites de fixation de facteurs de transcription.

notamment démontré son rôle lors de la SHM, et détaillé le mécanisme par lequel elle régule la CSR. La 3'RR semble pouvoir être divisée en deux "blocs fonctionnels" : d'une part le palindrome, formé des trois premiers enhancers et des séquences répétées inversées, et d'autre part hs4. Ce dernier serait responsable du contrôle de l'expression des chaînes lourdes et du BCR dans les lymphocytes B naïfs. La partie palindromique de la 3'RR interviendrait lors de l'activation de la cellule B en réponse à un antigène et permettrait l'augmentation de la transcription afin notamment d'induire la CSR et la SHM. La structure palindromique de la 3'RR est indispensable au déroulement optimal de la SHM, tandis que la simple présence des enhancers semble suffisante pour induire la CSR à un niveau proche des souris *Wt*.

Quelques questions persistent cependant, notamment sur le rôle des séquences répétées inversées. Si leur nécessité, notamment pour la SHM ne fait pas de doute, il reste à découvrir par quel(s) mécanisme(s) elles agissent. Ainsi, nos données ne permettent pas d'exclure l'hypothèse que l'effet observé soit du à la réduction de la distance séparant les enhancers, ou à la délétion d'éventuels sites de fixation de facteurs de transcription dans les séquences répétées inversées (Bulger and Groudine, 2010). Cependant l'hypothèse du rôle de ces sites de fixation semble peu crédible, car si la structure palindromique est très conservée dans l'évolution, la séquence des régions répétées inversées varie d'une espèce à l'autre (D'Addabbo et al., 2011).

Une façon d'élucider définitivement le rôle de la structure palindromique et des séquences répétées inversées serait la création de nouveaux modèles (**Fig. 48**). Le premier serait une inversion de l'orientation de la séquence entre hs3a et hs1.2, qui permettrait de perturber l'architecture palindromique tout en conservant d'éventuels sites de fixation de facteurs de transcription. Les suivants consisteraient à remplacer les séquences répétées inversées par des séquences d'ADN dépourvues de sites de fixation de facteurs de transcription, en conformation palindromique ou non. L'analyse simultanée de ces modèles, couplée aux résultats déjà obtenus, permettrait de déterminer définitivement l'importance relative de la structure palindromique, de la distance entre les *enhancers* et des sites de fixation de facteurs de transcription au sein des séquences répétées inversées.

Les techniques de capture de conformation (3C pour Chromosome Conformation Capture, puis 4C et 5C) ont permis de démontrer que l'action d'un *enhancer* sur un promoteur nécessite une interaction directe avec le promoteur. Plusieurs études suggèrent que les séquences encadrant les enhancers puissent intervenir dans la mise en place de ces

interactions (Bulger and Groudine, 2010). Il serait intéressant de réaliser des expériences de 5C sur nos modèles murins pour étudier l'impact de la suppression de la structure palindromique sur les interactions entre les *enhancers* et les différents promoteurs du locus IgH.

Nous avons démontré que la 3'RR régule la CSR en activant spécifiquement la région *switch* acceptrice en réponse à une stimulation adaptée. La délétion de la 3'RR provoque un blocage en cours de CSR, puisque les DSB dans S μ restent induites à une fréquence importante. Les cellules restent ainsi dans un état "d'attente" et modifient de façon transitoire leurs transcriptomes afin d'optimiser la réparation des DSB et ainsi limiter le risque de translocations potentiellement oncogéniques. Nos résultats suggèrent également que l'activation de S μ est moins dépendante de la 3'RR que celle des régions acceptrices, ce qui indiquerait qu'un autre élément peut compenser l'absence de 3'RR. Le candidat le plus probable pour assumer ce rôle est l'enhancer E μ , même s'il n'est pas requis pour la CSR lorsque la 3'RR est présente (Marquet et al., 2014). L'analyse d'un modèle en cours de développement au laboratoire portant la double délétion E μ /3'RR devrait permettre de répondre à cette question.

Nous avons également étudié le mécanisme encore mal connu de la CSR vers IgD. Cette CSR présente des caractéristiques différentes des CSR classiques : elle utilise majoritairement la voie de l'AEJ, est indépendante de la 3'RR, et la fréquence de mutations de part et d'autre des jonctions est plus faible que dans les CSR classique, indiquant un ciblage moins important par AID. Il reste encore à déterminer si cette CSR est induite en réponse à une stimulation précise, ou si la transcription simultanée des gènes μ et δ , modérément affectée en absence de 3'RR, est suffisante pour induire des DSB dans $\sigma\delta$. Dans le deuxième cas, l'augmentation de la CSR dans les souris 3'RR KO pourrait alors simplement s'expliquer par la disparition de la CSR vers les autres isotypes.

Les seules conditions permettant d'induire une CSR vers IgD détectable in vivo semblent être l'injection d'anticorps anti-IgD par intra-veineuse (Mountz et al., 1990). Ceci suggère que la stimulation spécifique du BCR IgD est requise soit pour induire cette CSR, soit pour assurer la survie des cellules ayant *switché* vers IgD. Il serait donc intéressant d'injecter des anticorps anti-IgD aux souris 3'RR KO, ou encore de les infecter avec des pathogènes capables de se fixer sur les régions constantes de l'IgD. Parmi les deux bactéries dont l'interaction avec IgD a été le plus étudié, *Haemophilus influenzae* semblerait le meilleur

choix. En effet, la protéine MID exprimée par *Moraxella catarrhalis* ne se fixe que sur l'IgD humaine (Jendholm et al., 2008). La stimulation par des bactéries semble plus intéressante que la simple injection d'anticorps anti-IgD, puisque les différentes molécules présentes à la surface des bactéries jouent vraisemblablement un rôle de coactivateurs, notamment *via* les TLR. Toutefois, ces expériences semblent compliquées à mener dans notre animalerie en raison de contraintes sanitaires.

L'hypothèse d'un blocage des CSR "classiques" facilitant la CSR vers IgD avait déjà été évoquée dans le contexte de la protection contre l'auto-immunité (Zheng et al., 2004; Koelsch et al., 2007). Dans ce cas, les CSR "classiques" seraient bloquées pour éviter la création de cellules autoréactives *switchées*. Que ce blocage soit dû à un éventuel mécanisme de protection contre l'autoimmunité ou à l'absence d'activation des régions *switchs* lorsque la 3'RR est délétée, les conséquences seraient identiques : en absence de compétition des régions *switchs* acceptrices, la probabilité de jonctions entre les cassures dans S μ et les rares cassures dans $\sigma\delta$ augmenteraient. Par analogie, cette absence de CSR "classique" pourrait faciliter la LSR en augmentant la probabilité de jonctions entre S μ et les cassures dans les régions LS de la 3'RR, ce qui permettrait alors l'élimination de ces cellules par apoptose.

La majeure partie de nos travaux visait à déterminer comment la délétion de la 3'RR perturbe les différentes étapes du développement lymphocytaire B. Maintenant que nous connaissons l'impact de cette délétion sur la SHM, la CSR, mais également sur la répartition des sous populations lymphocytaires B, il serait intéressant de rechercher les conséquences de ces phénotypes à l'échelle de l'organisme.

Nous avons initié récemment un projet visant à rechercher la présence d'anticorps poly- et/ou autoréactifs dans les souris 3'RR KO. En effet, plusieurs éléments suggèrent que les souris 3'RR pourraient présenter un contexte favorable au développement de l'autoimmunité :

- La diminution de l'expression du BCR, accompagnée d'une légère baisse de l'intensité de signalisation *via* cette voie pourrait faire diminuer le signal induit par la fixation d'un auto-antigène lors des *checkpoints* qui ponctuent le développement B, le faisant passer sous le seuil de détection nécessaire à l'induction de l'apoptose.
- L'absence de SHM sur les chaînes lourdes perturbe la maturation d'affinité.

- L'absence de 3'RR empêche la LSR qui, comme évoqué précédemment, pourrait être un mécanisme de suppression des cellules auto-réactives.

Les premiers résultats obtenus par ELISA et immunofluorescence sur cellules Hep2 semblent confirmer la présence d'IgM poly- et autoréactifs dans les sérums des souris 3'RR KO.

Il serait également intéressant de croiser nos souris avec des modèles favorables à l'apparition de pathologies auto-immunes, telles que les souris MRL/lpr. Une étude a démontré que la délétion d'AID dans ces souris empêche le développement des symptômes rénaux associés au lupus en inhibant la production d'IgG auto-réactives (Jiang et al., 2007). Il est possible qu'on observe un effet similaire dans les souris 3'RR KO puisque ces souris présentent des défauts marqués à la fois dans la CSR vers IgG et dans la synthèse d'Ig. Ces résultats montreraient que la 3'RR est une cible potentielle pour le traitement de certaines pathologies auto-immunes. Les inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi) qui induisent une baisse de l'expression du locus IgH via une action sur la 3'RR semblent représenter une piste prometteuse. En effet, le traitement de souris par le panobinostat, un HDACi, a induit une forte baisse de la réaction autoimmune (Lu et al., 2005; Waibel et al., 2015).

D'autre part, j'ai également participé au cours de ma thèse à l'étude du rôle de la 3'RR lors de la lymphomagenèse. Nous avons notamment démontré que la délétion de la 3'RR influence le développement de tumeurs induits par des translocations n'impliquant pas le locus IgH. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés en annexe.

Annexes

Annexe 1 : 3'RR et lymphomagenèse

The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice.

Saad F, Saintamand A, Cogné M & Denizot Y.
Oncotarget. 2015, Volume 6, numéro 24, pages 20302-20311.

3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy?

Saintamand A, Saad F & Denizot Y.
Cell Cycle. 2015, Volume 14, numéro 6, pages 789-790.

A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis.

Saintamand A, Saad F & Denizot Y.
Cell Cycle. 2015, Volume 14, numéro 13, pages 1987-1988.

Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas.

Saintamand A, Garot A, Saad F, Moulinas R & Denizot Y.
Cell Cycle. 2015, Volume 14, numéro 22, pages 3656-3658

Les résultats présentés dans ces articles sont en partie issus des travaux de Faten Saad, auxquels j'ai participé en marge de mes travaux de thèse. L'objectif de l'étude ayant abouti à la publication du premier article était d'étudier l'impact de la délétion de la 3'RR lors de la lymphomagenèse induite par une translocation ne touchant pas le locus IgH. Pour cela, nous avons croisé des souris porteuses d'un transgène contenant l'oncogène c-myc placé sous le contrôle des *enhancers* du locus Igλ (souris c-myc-Igλ) avec les souris 3'RR KO. Les résultats de ces travaux ainsi que ceux déjà obtenus précédemment (Saad et al., 2014) ont été commentés dans deux éditoriaux publiés dans la revue *Cell Cycle*, qui traitent de la pertinence de la 3'RR comme cible thérapeutique lors de la lymphomogenèse et de la façon dont la 3'RR influence le développement de tumeurs n'impliquant pas de translocation au locus IgH

Les résultats ont montré qu'en absence de 3'RR, les souris développent plus fréquemment des tumeurs de phénotypes immatures. Cet effet n'est pas du à une modification du niveau d'expression du transgène, mais plutôt à l'altération pourtant modeste du développement B dans les souris 3'RR KO (détaillée dans l'article 4). Ces résultats confirment que le développement et le phénotype d'une tumeur ne dépendent pas uniquement de l'altération oncogénique initiale et du stade auquel elle a lieu, mais également de la façon dont la cellule interagit avec son environnement. Ainsi, une baisse de la signalisation via le BCR et une altération du développement entre les stades B immatures et matures suffisent pour changer le profil de tumeurs initiées par la même mutation. Ces résultats sont en accord avec les différences de phénotypes observées dans les tumeurs exprimant un BCR IgM ou IgA (Amin et al., 2014).

Nous avons également pu démontrer que les tumeurs issues des souris c-myc-Igλ déficientes ou non pour la 3'RR présentent un phénotype de cellules pré-GC. A l'inverse, les lymphomes humains sont majoritairement issus de cellules post-GC, dans lesquelles AID contribue aux processus de lymphomagenèse (Robbiani and Nussenzweig, 2013). Ces résultats indiquent que la progression des lymphomes dans les modèles murins ne représente pas exactement ce qui existe chez l'Homme, et que les comparaisons entre les deux espèces doivent être faites avec précaution.

The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice

Faten Saad¹, Alexis Saintamand¹, Michel Cogné¹ and Yves Denizot

¹ CNRS UMR, CRIBL, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence to: Yves Denizot, email: yves.denizot@unilim.fr

Keywords: IgH 3' regulatory region; Igλ-Myc mice; B-cell lymphoma

Received: March 10, 2015

Accepted: April 10, 2015

Published:

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The IgH 3'regulatory region (3'RR), encompassing the four transcriptional enhancers hs3a-hs1,2-hs3b-hs4, has a key role on class switch recombination, somatic hypermutation, IgH transcription and B-cell fate. In plasma cells, transcribed IgH and IgL loci often colocalized in transcription factories and an IgL transcription defect might translate into lowered IgH transcription. We explored whether the 3'RR would affect lymphomagenesis in Igλ-Myc transgenic mice prone to lymphoproliferations. Breeding Igλ-Myc transgenics in a background deficient for the 3'RR influences lymphomagenesis toward less mature lymphomas (16% vs 54%, $p = 0.01$, Z test for two population proportions). In a 3'RR-deficient background mature tumors less often expressed the CD43 antigen (54% vs 0%, $p = 0.02$), a membrane glycoprotein expressed on activated mature B-cells. In contrast, in a 3'RR-deficient background tumors more often expressed the CD5 antigen (32% vs 12%, $p = 0.05$) that may serve to control autoimmunity and that is suspected to play a role in leukemic transformation. Lymphoma myc transcript levels, the Ki67 index of proliferation, the clonality, the usage of V(D)J segments, and their somatic hypermutation status were not affected in the 3'RR-deficient background. In conclusion, most probably through its action during the maturation process, the 3'RR can influence lymphomagenesis even when not linked with an oncogene.

INTRODUCTION

The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes multiple changes along B-cell differentiation, affecting transcription and accessibility to V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) [1, 2]. Since Ig gene remodelling events require transcription, *cis*-regulatory regions and especially transcriptional enhancers are major locus regulators. The IgH 3' regulatory region (3'RR) enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) promote IgH transcription [3], SHM [4] and CSR [5, 6] but not V(D)J recombination [7]. Ongoing recombination and mutation all along B-cell development make the IgH and Ig light (IgL) chain locus hotspots for translocations [8, 9]. Numerous lymphomas are thus marked by proto-oncogene translocation into the IgH locus such as cyclin D1, Bcl-2 and c-myc for mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and Burkitt lymphoma, respectively. Convincing

demonstration of the key contribution of the IgH and IgL enhancers in mature B-cell lymphomagenesis has been done by transgenic animal models. Thus, c-myc-3'RR and Igλ-Myc transgenics developed Burkitt lymphoma-like proliferation [10-15]. IgH and IgL enhancers may thus be potent activators of IgH/IgL-translocated oncogene transcription, even when breakpoints lie several hundred kb away from the enhancers. Thus, long-range interactions between the two regions of chromatin, through formation of a loop structure constitute an important mechanism of normal and abnormal gene transcription regulation by the 3'RR [2, 16]. Although IgL and IgH chains are encoded by loci located in different chromosome, nuclear positions of Ig alleles are coordinated according to ordered V(D)J recombination [17]. During B-cell activation one IgH allele more often associates with the nuclear periphery [18], while the chromatin context of both alleles appears similar in 4C experiments [19]. Observation of frequent inter-allelic (*trans*-) CSR in mammals also implies inter-

allelic proximity favoring recombination and synapsis between alleles [20, 21]. In plasma cells, transcribed IgH and IgL loci often colocalized in transcription factories and an IgL transcription defect might translate into lowered IgH transcription [22]. Until now, the role of the 3'RR in the development of B-cell lymphomas due to a IgL enhancer-mediated oncogene deregulation is unknown. We have explored whether the 3'RR would affect lymphomagenesis in Igλ-Myc transgenic mice prone to lymphoproliferations. The Igλ-Myc transgene induces the B-cell specific overexpression of the human c-myc oncogene leading to the progressive development of B-cell lymphomas [14].

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of 3'RR-deficient lymphoma mice

3'RR-deficient mice were crossed with Igλ-Myc mice (considered as *wt* in this study) to derive heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. The presence of the Igλ-Myc transgene (Figure 1A) and of the 3'RR-deleted allele (Figure 1B) was followed by using specific PCR.

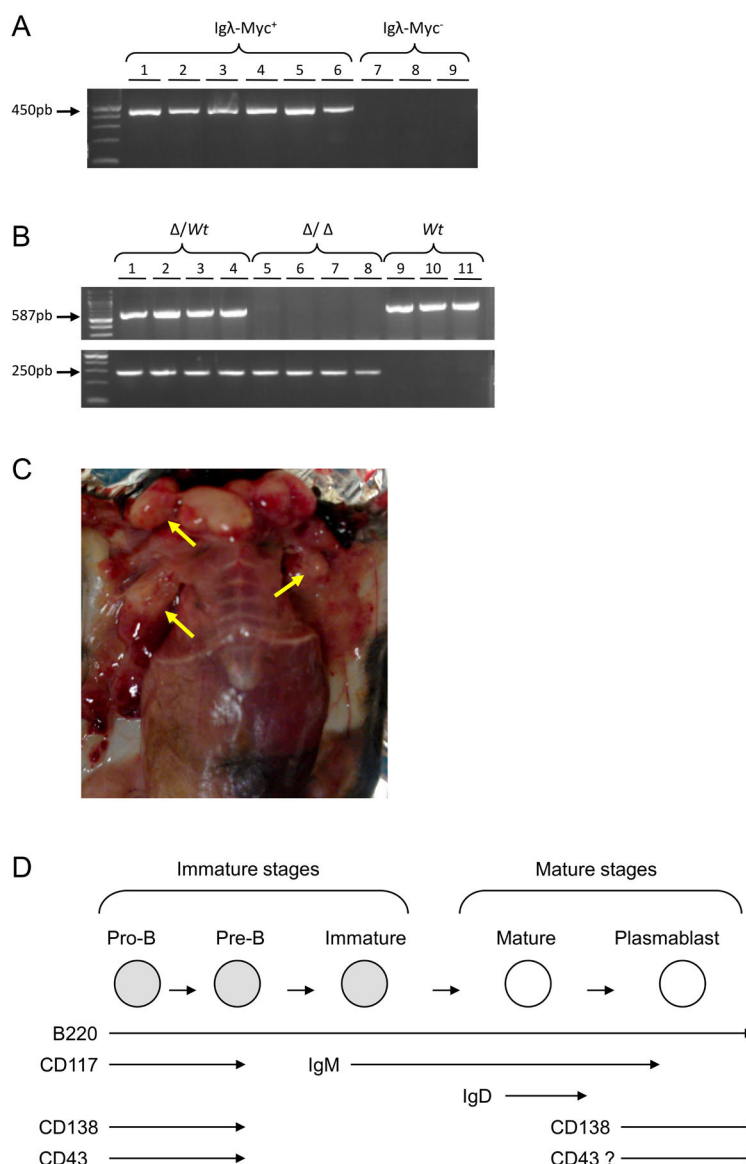


Figure 1: Igλ-Myc/3'RR-deficient lymphoma mice. **A.** A typical PCR profile for the detection of the Igλ-Myc transgene. Lines 1-6: six positive mice (amplification of a 450 bp fragment). Lines 7-9: three negative mice. **B.** A typical PCR profile for the detection of the 3'RR-deficient allele (amplification of a 250 bp fragment) and the 3'RR *wt* allele (amplification of a 587 bp fragment). Lines 1-4: four heterozygous 3'RR-deficient mice (Δ/wt). Lines 5-8: four homozygous 3'RR-deficient mice (Δ/Δ). Lines 9-11: three *wt* mice. **C.** Tumors in lymphoma mice. Arrows indicate lymphoma presence. **D.** Schematic representation of the B-cell development with the presence of several membrane cell markers. The “?” indicates the potential expression of the CD43 antigen on activated mature B-cells.

Characteristics of lymphomas in 3'RR-deficient lymphoma mice

After several weeks, mice developed lymphomas with obvious lymph node involvement (Figure 1C). According to the French law animal exhibiting tumors were sacrificed. At necropsy, lymphoma mice had enlarged lymph nodes and spleen. Mice with tumors showed leukemic peripheral blood involvement with circulating lymphoma cells. The numbers of total circulating white

blood cells were not different ($p > 0.05$, Mann-Whitney *U*-test) between Ig λ -Myc lymphoma mice ($136 \pm 28 \times 10^3$ cells/ μ l, $n = 10$), heterozygous 3'RR/Ig λ -Myc lymphoma mice ($495 \pm 194 \times 10^3$ cells/ μ l, $n = 17$) and homozygous 3'RR/Ig λ -Myc lymphoma mice ($175 \pm 33 \times 10^3$ cells/ μ l, $n = 18$) but elevated ($p = 0.02$, Mann-Whitney *U*-test) as compared with healthy Ig λ -Myc mice ($81 \pm 5 \times 10^3$ cells/ μ l, 4 mice) and healthy 3'RR-deficient mice ($71 \pm 7 \times 10^3$ cells/ μ l, 4 mice). Flow cytometry analysis of circulating lymphoma cells showed the same labelling pattern than spleen and lymph node lymphoma cells (Figure 2). Means

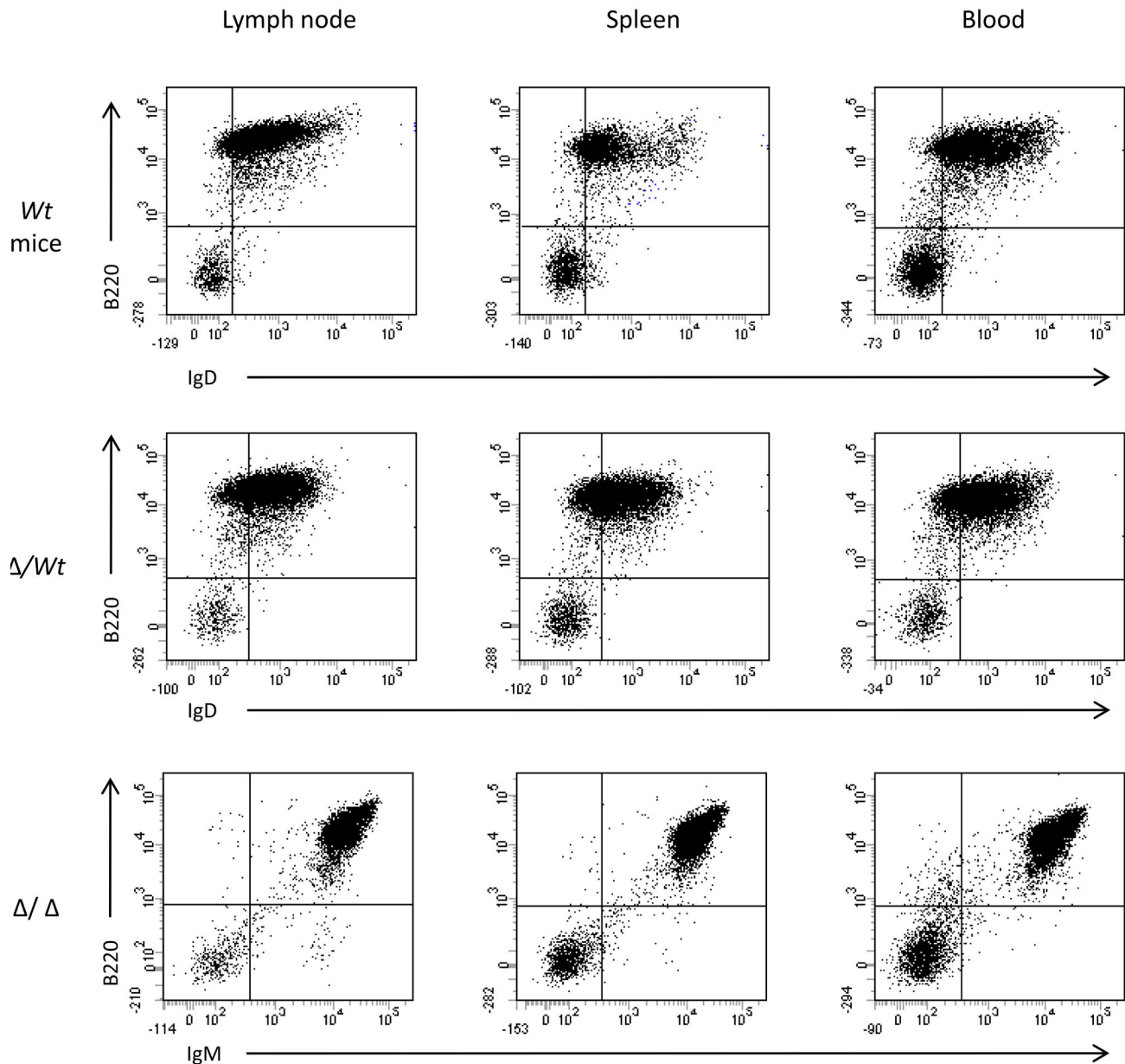


Figure 2: Flow cytometry analysis of lymphoma cells in spleen, lymph node and blood. Typical flow cytometry of lymphoma cells from lymph node, spleen and blood of lymphoma mice. Results of a B220/IgD labelling for an Ig λ -Myc mice (*wt*), of a B220/IgD labelling for a heterozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice (Δ/wt) and a B220/IgM labelling for an homozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice (Δ/Δ). Three representative profiles from 6 lymphoma mice (2 *wt*, 2 Δ/wt and 2 Δ/Δ).

of flow cytometry labelling were also similar (Figure 2) showing that lymphoma cells in lymph nodes, spleen and blood were identical. Lymphoma cells were not associated with liver and gut-associated lymphoid tissues (data not shown). All data reported below were obtained with lymph node lymphomas.

Lymphomas from 79 animals were investigated (24 *wt* mice, 30 heterozygous mice and 25 homozygous mice). During precursor B-cell differentiation, genes encoding H and L chains of an Ig molecule are somatically assembled from germline DNA. This process occurs in the bone marrow prior to antigenic challenge and leads to the successive formation of pro-B, pre-B and immature B-cells. B-cells mature in germinal centers and once

activated differentiate into Ig-secreting plasma cells (schematized in Figure 1D). Whether the membrane B220 marker is present all along B-cell maturation, stage specific markers characterise these different stages: expression of the membrane CD117/CD43/CD138 antigens on pro-B/pre-B-cells, expression of membrane IgM on immature B-cells, expression of membrane IgD on mature B-cells, re-expression of membrane CD138 on plasma cells and re-expression of membrane CD43 on activated mature B-cells (schematized in Figure 1D) [26]. Flow cytometry was used to monitor the immunophenotypic profile of lymphomas (typical profiles are reported in Figure 3). A B220⁺ population was characterized in all cases (100%, 79/79) while staining for T lineage (CD4 and

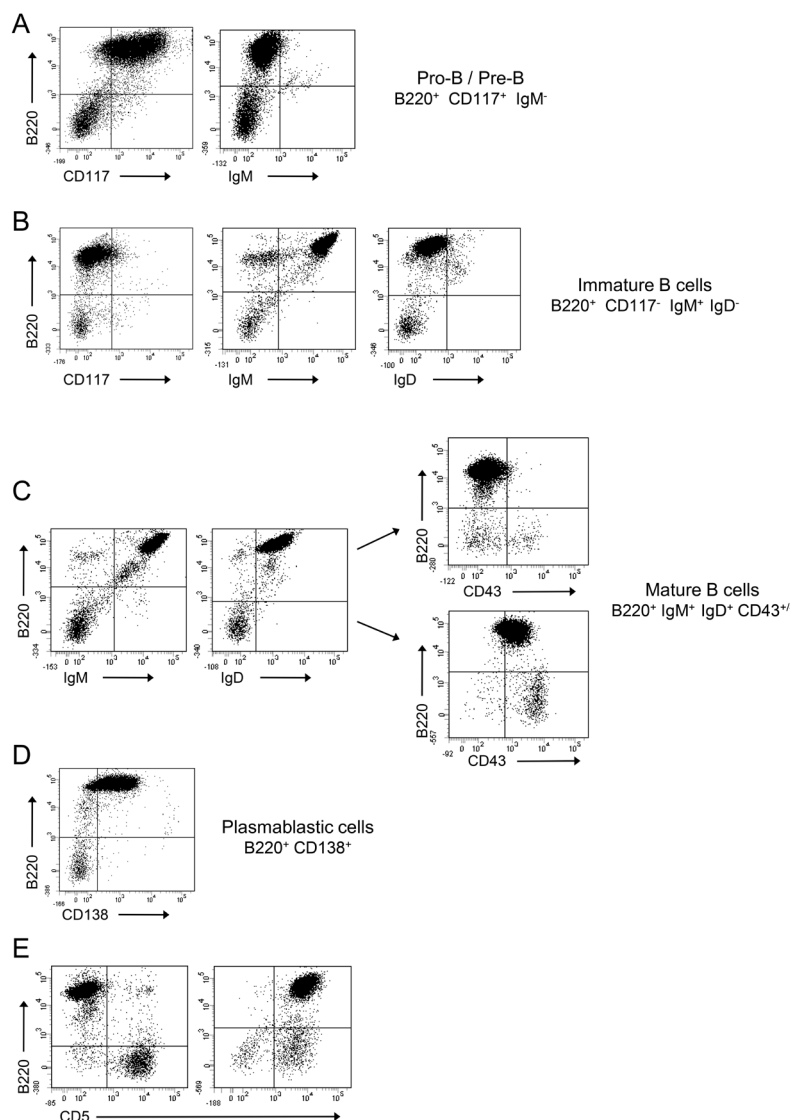


Figure 3: Flow cytometry analysis of Igλ-Myc lymphomas. Lymphomas were labelled with various antibodies and analyzed with flow cytometry. Lymphoma analysis revealed four major subtypes. **A.** pro-B/pre-B lymphomas (B220⁺CD117⁺IgM⁻); **B.** immature B-cell lymphoma (B220⁺CD117⁻IgM⁺IgD⁻); **C.** mature B-cell lymphoma (B220⁺IgM⁺IgD⁺ with or without CD43); **D.** plasmablastic B-cell lymphoma (B220⁺CD138⁺). **E.** Some lymphomas were CD5⁺. Representative B220/CD117, B220/IgM, B220/IgD, B220/CD43, B220/CD138 and B220/CD5 labelling were shown. Anti-B220 was conjugated with PC5. Anti-IgM, anti-IgD, anti-CD43 and anti-CD5 were conjugated with FITC. Anti-CD117 and anti-CD138 were conjugated with PE.

CD8) and monocyte/macrophage lineage (CD11b) was negative (data not shown). Percentages of pro-B/pre-B, immature B-cell, mature B-cell and plasmablastic B-cell lymphomas in Igλ-Myc, heterozygous 3'RR/Igλ-Myc and homozygous 3'RR/Igλ-Myc lymphoma mice are reported in Figure 4A. Deletion of the 3'RR significantly ($p = 0.01$, Z test for two population proportions) influenced the lymphoma maturation stage with reduced total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) mature lymphomas (16%, 4/25) compared to Igλ-Myc *wt* mice (54.1%, 13/24) (Figure 4B). Although reduced (36.6%, 11/30), mature lymphomas in heterozygous 3'RR/Igλ-Myc mice were not significantly different ($p > 0.05$, Z test for two population proportions) compared

to Igλ-Myc *wt* mice. CD43 is a sialylated single chain membrane glycoprotein expressed on activated mature B-cells [27]. Deletion of the 3'RR significantly ($p < 0.05$, Z test for two population proportions) reduced the number of CD43⁺ mature B-cell lymphomas. CD43 is thus present on 54% (7/13), 73% (8/11) and 0% (0/4) of total mature B-cell lymphomas of *wt*, heterozygous and homozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice, respectively (Figure 4C). CD5 is a transmembrane glycoprotein on the surface of some B-cells associated with the B-cell receptor. CD5 might have a major negative influence on antigen receptor driven-B-cell function and may serve to control autoimmunity [28]. The number of CD5⁺ B-cell lymphomas is higher ($p < 0.05$, Z test for two population

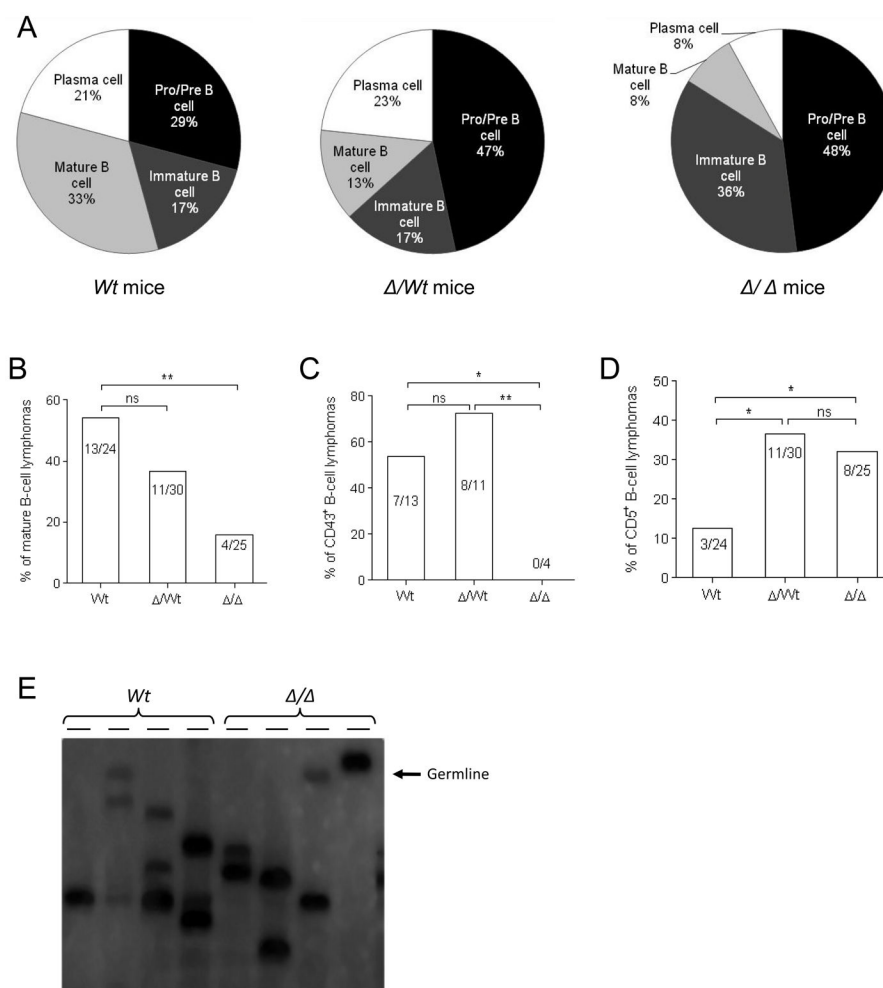


Figure 4: Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. **A.** Percentage of pro-B/pre-B lymphomas, immature B-cell lymphomas, mature B-cell lymphomas and plasmablastic B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). **B.** Percentage of total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, Z test for two population proportions. **C.** Percentage of total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) CD43⁺ mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Z test for two population proportions. **D.** Percentage of total CD5⁺ B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, Z test for two population proportions. **E.** Lymphoma clonality. Southern blot analysis was used to examine lymphoma clonality with a J_{H4} probe. Genomic DNA was prepared and digested with *EcoRI* from lymph node cells of Igλ-Myc mice (*wt*) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). The arrow located the germinal band.

proportions) in heterozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice (36%, 11/30) and homozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice (32%, 8/25) than in *wt* Igλ-Myc mice (3/24, 12%) (Figure 4D).

All along B-lymphocyte development, cell survival is dependent from BCR expression and signalling. IgH transcription is markedly reduced in 3'RR-deficient mice even if BCR expression, signalling and B-cell compartments (except for marginal zone B-cell one) are roughly normal [3]. The lower percentage of total mature B-cell lymphomas in the 3'RR-deficient background might be linked to a lowered maturation speed unmasked by the *c-myc*-induced lymphoproliferation context. The lower percentage of CD43 activated mature B-cell lymphomas in the 3'RR-deficient background is coherent with this hypothesis. CD5⁺ B-cells have distinct functional properties compared with B-cells lacking CD5. In B-cells, CD5 associates with the BCR and is suspected to maintain energy in mouse B-cells. CD5 also promotes multiple intracellular signalling pathways in B-lymphocytes [29] and CD5⁺ B-cells are more resistant to apoptose than CD5⁻ B-cells [28]. The elevated CD5⁺ B-cell lymphomas in 3'RR-deficient Igλ-Myc mice might unmask a role of the CD5 antigen in leukemic transformation as previously suggested [29]. The role of the 3'RR deletion on the CD5⁺ B-cell fate deserves now further investigations. Finally, taken altogether these results reinforce a recent

study reporting that the class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a *c-myc* deregulation transgenic model [13].

Clonal origin of lymphomas

Southern analysis of V(D)J recombinations showed that all B-cell lymphomas had undergone clonotypic Ig rearrangements. Thus, the use of a J_{H4} probe revealed rearranged bands in addition to the germline band indicating the clonal origin of lymphomas from Igλ-Myc mice with or without the 3'RR (Figure 4E).

Ki67 expression of lymphomas

The proliferative activity of tumor cells was investigated with the nuclear protein Ki67 found during G₁, S, G₂ and M phase of the cell cycle. The percentage of Ki67⁺ cells was high and similar in Igλ-Myc mice (91%, 12 mice), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (87%, 21 mice) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (89%, 21 mice) showing that the intensive lymphoma proliferation was not affected by deletion of the 3'RR. These results are in agreement with the lack of effect of the 3'RR deletion on the growth of normal B-cells [5].

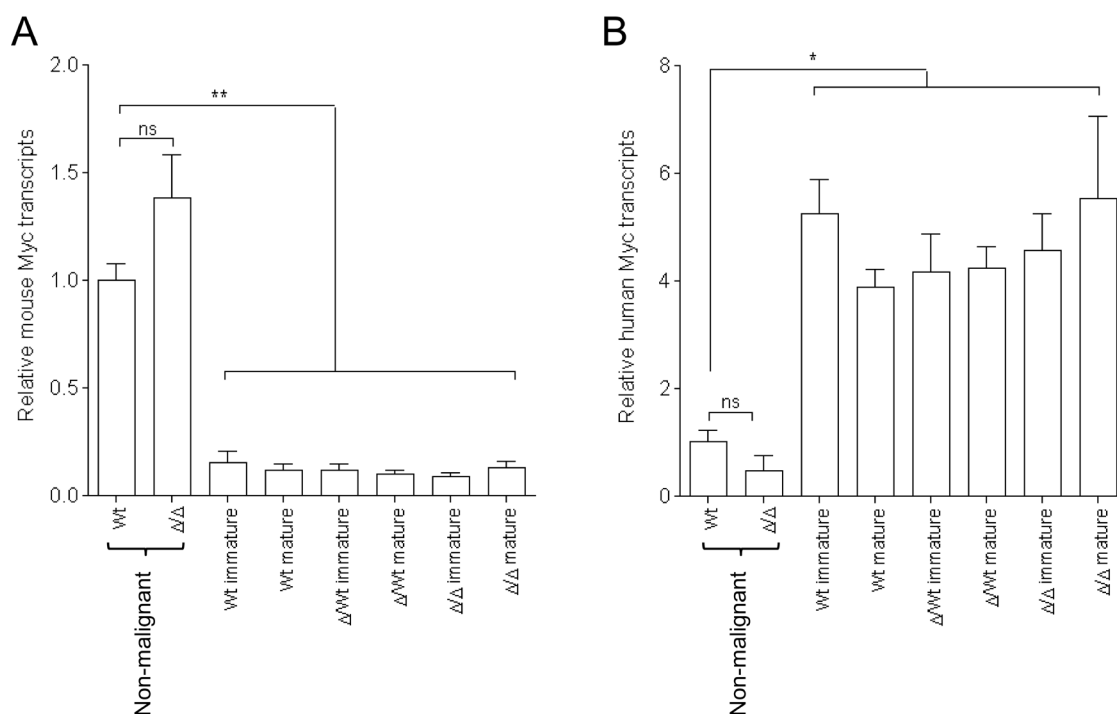


Figure 5: Murine and human *c-myc* transcripts in Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. Murine **A.** and human **B.** *c-myc* transcripts in immature and mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). Five immature and five mature B-cell lymphomas for *wt* mice. Eight immature and eleven mature B-cell lymphomas for Δ/wt mice. Eleven immature and seven mature B-cell lymphomas for Δ/Δ mice. Pre-malignant splenic B-cells of four *wt* and four Δ/Δ mice were used as controls. **p* < 0.01 and ***p* < 0.001 (Mann-Whitney *U*-test).

Mouse and human c-myc transcripts in lymphomas

Igλ-Myc mice carried an Igλ-Myc transgene containing a translocated MYC gene from the human Burkitt lymphoma cell line IARC-BL60 under the transcriptional control of the IgL λ chain regulatory sequences [14]. Thus the dual analysis of both human transgenic myc transcripts and endogenous mouse myc transcripts can be investigated in Igλ-Myc mice. We analyzed mouse splenic B-cells in 8 week old homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice and Igλ-Myc mice before any manifestation of disease. Mouse and human myc transcripts levels in splenic B-cells were not affected by the 3'RR-deficient background (Figure 5A and 5B). Similarly,

the shift between mouse and human myc transcript levels in B-cell lymphomas of Igλ-Myc mice was not affected. For these experiments purified splenic B-cells of 8-weeks old mice prior any manifestation of disease were used as controls. This was done because lymphomas arose from axillary, parotid, and submandibular lymph nodes (Figure 1C) and that in steady state conditions it is impossible to obtain sufficient amounts of purified lymph node B-cells from 8-weeks old mice. Finally, human myc transcript levels were similar in immature and mature B-cell lymphomas (Figure 5B). Taken together these results suggest that the tumoral process is not affected by the 3'RR-deficient background, reinforcing the hypothesis that the lowered lymphoma maturity in 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice is related to a difference on cell maturity of the cell of origin of the B-cell lymphoma.

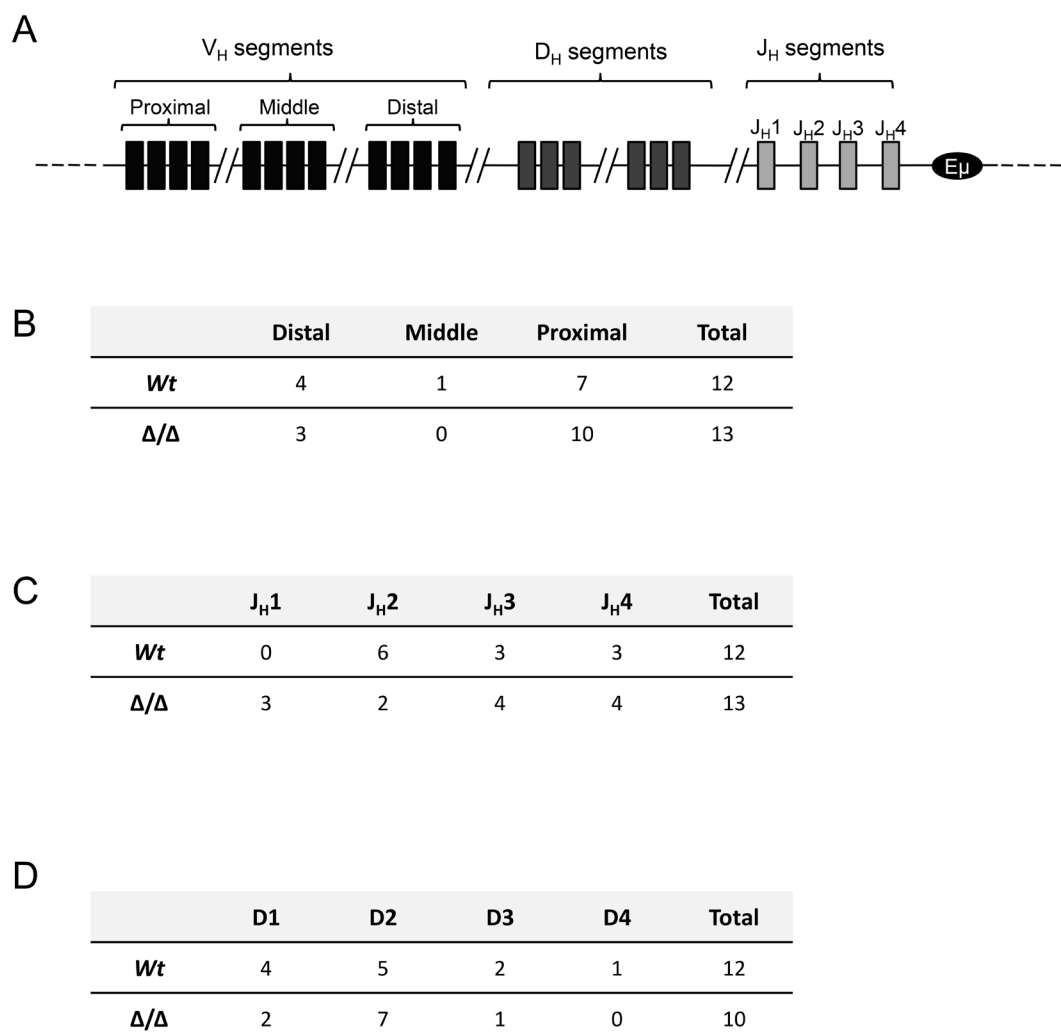


Figure 6: V(D)J usage in Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. **A.** Schematic representation of segments of variability (V), diversity (D) and junction (J) in the IgH mouse locus. **B.** Analysis of distal, middle or proximal V genes in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. **C.** Analysis of J segments in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. **D.** Analysis of D segments in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. Three D segments from lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice cannot be determined after amplification, cloning and sequencing of the V-D-J segment due to high mutations/insertions/deletions located at the V-D and D-J junctions.

Analysis of Ig VH mutations in lymphomas

We then analysed the mutation status of V_H rearranged genes in B-cell lymphomas. This study was made possible because of their clonal nature (Figure 4E). The 150 bp located downstream the J_{H4} exon were investigated as an hot spot of somatic hypermutation [4]. All lymphomas revealed unmutated sequences and thus featured a pre-germinal centre origin (results from four *wt* lymphomas, three heterozygous 3'RR lymphomas, three homozygous 3'RR lymphomas, ten sequences for each lymphoma) (data not shown). The lack of somatic hypermutations in lymphomas from Ig λ -Myc mice is in agreement with their absence in lymphomas from iMyc^{Ep} mice [30] and reinforced the hypothesis that most mice lymphomas arise from naïve B-cells. It is interesting to note that most human B-cell lymphomas are mutated suggesting that the cell of origin of human and mouse lymphomas differs suggesting multifactorial route to tumor development and that correlations between human lymphomas and mice models should be made cautiously.

Analysis of V(D)J recombination in lymphomas

The mouse IgH locus contains about 200 variable (V_H) genes subdivided into domain-organized gene families, including the distal V_H (the largest family) and the proximal V_H family. V_H genes are followed by a dozen of diversity (D) segments and four junction (J) segments. We then analysed if 3'RR deficiency affected the type of V, D and J used to express the B-cell receptor at the membrane of B-cell lymphomas. This study was made possible because of their clonal nature. As shown in Figure 6, lack of the 3'RR did not affect the use of either V, D and J segments. This study confirms that the 3'RR is not implicated in V(D)J recombination confirming previous studies using non lymphoma B-cells [7, 31].

MATERIALS AND METHODS

Generation of transgenic mice

3'RR-deficient mice [5] were crossed with Ig λ -Myc mice [14] to derive heterozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice and homozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice. Mice exhibiting obvious tumors or presenting signs of illness were immediately sacrificed. Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation.

PCR

PCR experiments for detection of the *wt* 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-CCAAAATGGCCAGGCCTAGG-3' and reverse 5'-GACCCTGTCCTATGGCT GAC-3' primers [23]. PCR experiments for detection of the deficient 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-TCCCTGGACAATCTGCACAT-3' and reverse 5'-GACCCTGTCCTATGGCTGAC-3' primers [23]. Amplification products were analysed on a 1.2% agarose gel. Expected sizes of amplified products were 250 bp and 587 bp for mutated and *wt* alleles, respectively. PCR experiments for detection of the Ig λ -Myc transgene were carried out with specific forward 5'-GCTCGTCTCAGAGAAGCTGG-3' and reverse 5'-ATCTCTCCAGATCTGCTATCTC-3' primers. Amplification products were analysed on a 1.2% agarose gel. Expected size of amplified products was 450 pb.

Flow cytometry analysis

Single-cell suspensions from lymph node tumors and spleen were labelled with PC5 anti-B220, PE anti-CD117, FITC anti-CD43, FITC anti-IgM, FITC anti-IgD, FITC anti-CD5, PE anti-CD138, PE anti-CD4, PC5 anti-CD8 and FITC anti-CD11b antibodies (Southern Biotechnologies) and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter) [24, 25]. For intracellular labelling experiments, cells were fixed and permeabilized with the IntraprepTM permeabilization reagent (Beckman Coulter) according to the manufacturer's recommendations prior to incubation with FITC anti-Ki67 (Becton Dickinson) or irrelevant antibodies (Cell signalling Technology, Inc).

Clonality assay

Genomic DNA prepared from lymph node lymphomas was digested with *Eco*RI and analysed by Southern blot with a ³²P-labeled J_H probe [10].

mRNA expression

Total RNA was extracted from lymph node lymphomas. RNA was reverse-transcribed into cDNA by addition of reverse transcriptase to 2 μ g total RNA in a final volume of 20 μ l. Real time PCR was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents and analysed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems Foster City, CA) [25]. Product reference: mouse *c-myc*, Mm00487803-m1; human *c-myc*, Hs00153408-m1. Mouse actin (Mn00607939-s1) was used for normalization of gene expression levels (Applied Biosystems). In another set of experiments, RNA was extracted from

splenic B-cells (purified by CD43 magnetic cell sorting) of 8 week old Igλ-Myc/3'RR-deficient mice and Igλ-Myc mice (*i.e.*, before any manifestation of disease).

Sequence analysis of expressed V(D)J rearrangements

Genomic DNA extracted from tumors was amplified by PCR. Forward primers: V_HJ558 5'-GCGAAGCTTARGCCTGGG RCTTCAGTGAAG-3', V_HQ52 5'-GCGAAGCTTCTCACAGAGCCTGTCCATCAC-3', V_H7183 5' - CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC - 3' and backward primer: J_{H4} 5'-AGGCTCTGAGATCCCTAG ACAG-3'. The PCR products were cloned into the Zero Blunt® Topo® PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer).

CONCLUDING REMARKS

Results of the present study indicate that the IgH 3'RR influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice. The 3'RR did not directly act on the lymphomagenetic process but on the maturity of the cell of origin of the lymphoma. The 3'RR is a major lymphoma oncogene deregulator [8, 10-13]. Targeted inhibition of the 3'RR could provides a therapeutic strategy for the treatment of a wide range of mature B-cell lymphomas, specifically those with oncogene translocation into the IgH locus [23, 32].

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC PJA 20141201649), ANR (Projets Blanc 2011), Ligue Contre Cancer de la Corrèze (subvention 2015) and Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud. We thank Pr. Georg Bornkamm (Helmholtz Center, Munich, Germany) for sending us Igλ-Myc transgenics.

Contribution section

F.S., A.S., M.C. and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. M.C. and Y.D. participated to the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

REFERENCES

1. Henderson A, Calame K. Transcription regulation during B-cell development. *Ann Rev of Immunol.* 1998; 16: 163-200.
2. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110: 27-70.
3. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, Oblet C, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region governs κ chain transcription in mature B lymphocytes and the B-cell fate. *Oncotarget.* (in press).
4. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med.* 2013; 210: 1501-1507.
5. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 2010; 116: 1895-1898.
6. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med.* 2014; 211: 975-985.
7. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem.* 2012; 287: 8356-8360.
8. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 3306-3311.
9. Lin P, Jetly R, Lennon PA, Abruzzo LV, Prajapati S, Medeiros LJ. Translocation (18;22)(q21;q11) in B-cell lymphomas: a report of 4 cases and review of the literature. *Human Pathol.* 2008; 39: 1664-1672.
10. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B-cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol.* 2007; 179: 6033-6042.
11. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and c-myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol.* 2012; 180: 1688-1701.
12. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53^{+/+} mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but

similar cellular origin. *Oncotarget*. 2012; 3: 586-593.

13. Amin R, Marfak A, Pangault C, Chanut A, Tarte K, Denizot Y, Cogné M. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget*. 2014; 5: 8995-9006.
14. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Taddesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, Gerbitz A, Klobeck G, Hoernagel K, Polack A, Bornkamm GW, Janz S, Morse III, HC. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med*. 2000; 192: 1183-1190.
15. Fish K, Chen J, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. *Blood*. 2014; 123: 530-540.
16. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogné M, Pinaud E, Kenter AL. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity*. 2007; 27: 711-722.
17. Hewitt SL, Yin B, Ji Y, Chaumeil J, Marszalek K, Tenthorey J, Salvaggio G, Steinell N, Ramsey LB, Ghysdael J, Farrar MA, Sleckman BP, Schatz DG, Busslinger M, Bassing CH, Skok JA. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat Immunol*. 2009; 10: 655-664.
18. Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K, Dillon N, Gray D, Perry RP, Merkenschlager M, Fisher AG. Nonequivalent nuclear position of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol*. 2001; 2: 848-854.
19. Holwerda SJB, van de Werken HJG, de Almeida CR, Bergen IM, de Bruijn MJW, Verstegen MJAM, Simonis M, Splinter E, Wijchers PJ, Hendriks RW, de Laat W. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 6905-6916.
20. Laffleur B, Bardet SM, Garot A, Baylet A, Cogné M. Immunoglobulin undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun*. 2014; 15: 341-346.
21. Reynaud S, Delpy L, Fleury L, Dougier HL, Sirac C, Cogné M. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J Immunol*. 2005; 174: 6176-6183.
22. Park SK, Xiang Y, Feng X, Garrard WT. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev*. 2014; 28: 1159-1164.
23. Saad F, Saintamand A, Rouaud P, Denizot Y. Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* inflammatory response in mice. *Oncoscience*. 2014; 1: 591-598.
24. Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol*. 2009; 182: 6926-6932.
25. Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, Laffleur B, Magnonne V, Cogné M, Denizot Y. A p53 defect sensitizes various stages of B-cell development to lymphomagenesis in myce carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J Immunol*. 2011; 187, 5772-5782
26. Tung JW, Herzenberg LA. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 150-155.
27. Treasure J, Lane A, Jones DB, Wright DH. CD43 expression in B-cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 1018-1022.
28. Sigal LH. Basic science for the clinician 45: CD5. *J Clin Rheumatol*. 2012; 18: 83-88.
29. Mageed RA, Garaud S, Taher TE, Parikh K, Pers JO, Jamin C, Renaudineau, P. Youinou. CD5 expression promotes multiple intracellular signalling pathways in B lymphocytes. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 795-798.
30. Zhu D, Feng C, Morse III HC, Janz S, Stevenson FK. Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse 'Burkitt-like' lymphomas from naïve B-cells. *Blood*. 2005; 105: 2135-2137.
31. Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Ido M, Tamir IM, Schwickert T, Novatchkova M, Sun Q, Huis in 't Veld PJ, Guo C, Yoon HS, Denizot Y, Holwerda SJB, et al. Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity*. 2013; 39: 229-244.
32. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle*. 2015; 14: 789-790.

3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy?

Alexis Saintamand, Faten Saad, and Yves Denizot*

CNRS UMR 7276; CRIBL; Université de Limoges; Limoges, France

During precursor B-cell differentiation, heavy (H) and light chain genes of an immunoglobulin (Ig) molecule are somatically assembled from germline DNA. This V(D)J recombination process occurs in the bone marrow prior to antigenic challenge (Fig. 1). In germinal centers, variable (V) regions become the target of somatic hypermutation (SHM) in activated B-cells generating high-affinity Ig (Fig. 1). In mature B-cells, class-switch recombination (CSR) deletes the constant (C) μ region and replaces it with a downstream C_H gene. This enables B-cells to express various Ig isotypes without affecting antigen specificity (Fig. 1). Once activated, B-cells differentiate into Ig-secreting plasma cells. During B-cell development, V(D)J recombination, SHM, CSR and Ig synthesis are coupled with transcriptional accessibility of the IgH loci. IgH transcription is controlled by complex functional interactions of multiple enhancers, promoters and insulators spread among the 2.5 megabases of the locus. Among them, the 3' regulatory region (3'RR) stands out as a major player during late stages of B-cell maturation (*i.e.*, SHM, CSR and Ig synthesis).^{1,2}

Ongoing recombination and mutation all along B-cell development make the IgH locus a hotspot for translocations. Numerous lymphomas are marked by proto-oncogene translocation into the IgH locus. Cyclin D1 and Bcl-2 translocations, found respectively in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma, take place during the V(D)J recombination. Cyclin D1/D3 or *c-maf* translocations

observed in myeloma are obviously linked to CSR. *c-myc* translocation, the typical hallmark of Burkitt lymphoma, is linked to SHM or CSR. The mouse 3'RR, located downstream of the IgH C α gene, shares a strong structural homology with the regulatory regions located downstream of each human IgH C α gene (C α 1 and C α 2). Mouse models exploring the role of the 3'RR in B-cell physiology and in B-cell malignancies should provide useful indications about the pathophysiology of human B-cell proliferations. Convincing demonstration of the key contribution of the 3'RR in mature B-cell lymphomagenesis has been done by transgenic animal models. *c-myc*-3'RR transgenics developed Burkitt lymphoma-like proliferation,³ and the knock-in of a 3'RR cassette upstream of the endogenous *c-myc* gene induced B-cell lymphomas.⁴ Interestingly the phenotype of lymphoproliferations induced by the *c-myc*-3'RR transgene is affected by the presence of associated mutations in key cell cycle dependent genes such as p53 or Cdk4.⁵

Knock-out models have clarified the functions of the 3'RR as essential for high-rate IgH transcription at the plasma cell stage.² 3'RR may thus be a potent activator of IgH-translocated oncogene transcription, even when the breakpoints lie several hundred kb away from the 3'RR. Long-range interactions between the 2 regions of chromatin, through formation of a loop structure, constitute an important mechanism of normal and abnormal gene transcription regulation by the 3'RR. Studies have reported interactions between the 3'RR and the IgH

variable region in normal and lymphoma-genetic contexts. Therefore, targeted inhibition of the 3'RR could theoretically provides a therapeutic strategy for the treatment of a wide range of mature B-cell lymphomas. However, the first step before considering the 3'RR as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy is to demonstrate the innocuousness of such an approach, and notably the absence of potent adverse effect on normal immune and inflammatory B-cell mediated responses. Induction of negative alterations on the physiological anti-lymphoma immune or inflammatory networks would be obviously a counterproductive approach. We have recently tested this prerequisite by investigating the *in vivo* pristane-induced inflammatory response in 3'RR-deficient BALB/c and *wt* BALB/c mice.⁶ The lack of the 3'RR in BALB/c mice has no significant effect on the incidence, the kinetic of development and the cellular composition (IgM⁺IgD⁺ B-cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, monocyte/macrophage cells) of peritoneal ascites. Moreover ascite pro- and anti-inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-21, IL-12/23, TNF- α IL-10, interferon- γ) are unaffected by the 3'RR-deficiency. Thus, a fully functional 3'RR is dispensable for the efficient recruitment of immune cells and the development of a normal inflammatory response in the *in vivo* pristane-induced inflammatory model.

In conclusion, the 3'RR is considered as a major lymphoma oncogene deregulator,³⁻⁵ and its deletion has no effect on immune and inflammatory responses in

*Correspondence to: Yves Denizot; Email: yves.denizot@unilim.fr

Submitted: 11/20/2014; Accepted: 11/20/2014

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1010964>

Comment on: Saad F, et al. Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* inflammatory response in mice. *Oncoscience* 2014; 1: 591-8; PMID:25594069.

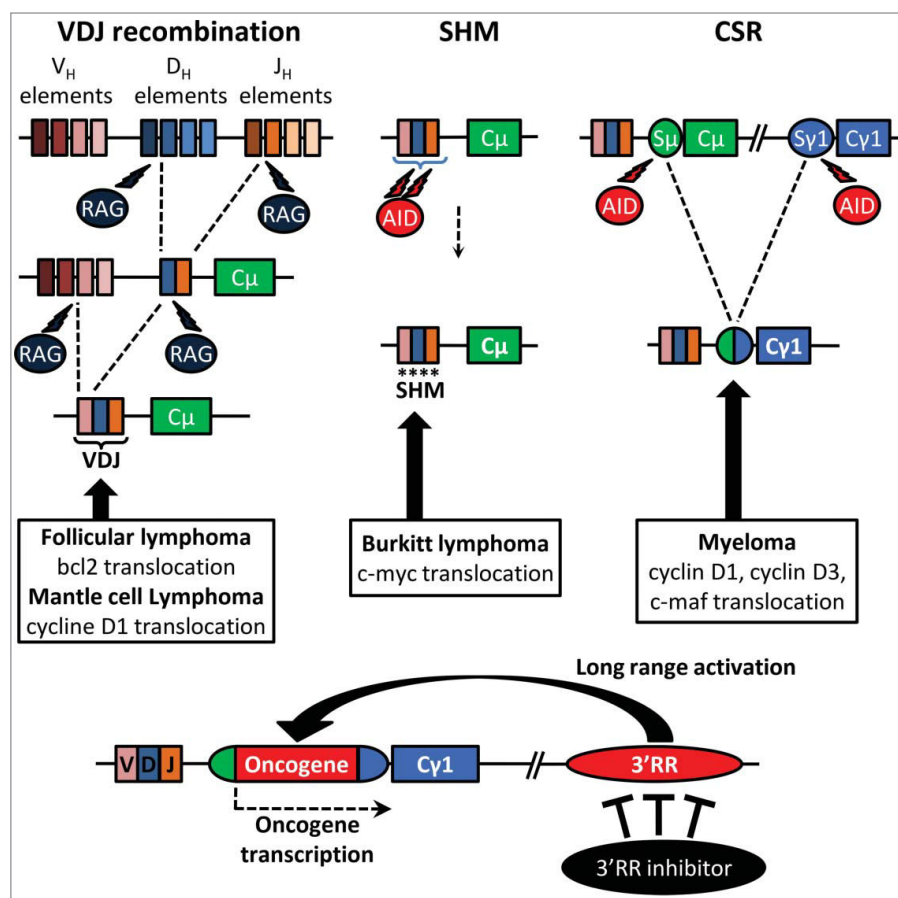


Figure 1. DNA recombination and mutations occur during B-cell maturation. RAG-induced (during VDJ recombination) and AID-induced (during CSR and SHM) DNA breaks are potential sites of oncogene translocations. The IgH 3'RR may act as an oncogene deregulator by its long range transcriptional activity. Targeting 3'RR transcriptional activity might be a therapeutic strategy for the treatment of mature B-cell lymphomas.

the pristane mouse model. It is, thus, tempting to speculate that the 3'RR might be considered as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy without significant impact on the normal immune and inflammatory networks. Previous results have reported that the 3'RR is a sensitive immunological target and that 3'RR activation and transcriptional activity can be altered by a diverse range of chemicals, including ones with anti-carcinogenic properties such as isothiocyanates,⁷ strengthening the hypothesis that altering 3'RR activity by chemicals could modulate the occurrence and severity of lymphomas. A limitation of the pristane mouse model is that inflammation is restricted to the peritoneal cavity. It is of evidence that other mouse models of inflammatory reactions must be tested before definitive validation of this hypothesis. Finally given the strong sequence homology between human and mouse 3'RR enhancers, mouse models could reveal useful tools for an *in vivo* study of lymphoma treatments based on IgH 3'RR down-regulation.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Vincent-Fabert C, et al. *Blood* 2010; 116:1895-8; PMID:20538806; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
2. Rouaud P, et al. *J Exp Med* 2013; 210:1501-7; PMID:23825188; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
3. Truffinet V, et al. *J Immunol* 2007; 179:6033-42; PMID:17947677; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6033>
4. Wang J, et al. *J Biol Chem* 2006; 280:12766-73; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412446200>
5. Rouaud P, et al. *Oncotarget* 2012; 3:586-93; PMID:22592113
6. Saad F, et al. *Oncoscience* 2014; 1:591-8; PMID:25594069
7. Henseler RA, et al. *Toxicology* 2009; 261:9-18; PMID:19447539; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.03.015>

A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis

Alexis Saintamand, Faten Saad, and Yves Denizot*

UMR CNRS 7276; CRIBL; Université de Limoges; France

During B-cell ontogeny and maturation, Ig loci undergo successive transcription coupled remodeling events: V(D)J recombination and class switch recombination (CSR) for the IgH locus, and VJ recombination for IgL loci. Both loci also undergo somatic hypermutation (SHM) to improve antibody affinity. RAG-mediated V(D)J recombination occurs during the early antigen-independent step of B-cell development. AID-mediated CSR and SHM occur later, and require interaction with cognate antigen. These transcription-induced events involve a succession of DNA breaks and repairs, and thus represent potentially oncogenic events, hence implying a strict regulation. Ig *cis*-regulatory elements and especially transcriptional enhancers are major locus regulators. While 5' *cis*-regulatory elements (E μ and E κ for IgH and Igk locus, respectively) control V(D)J recombination, SHM is controlled by the IgH 3' regulatory region (3'RR)¹ (for IgH locus) and the 3'E κ (for Igk locus). The 3'RR is also the master regulator of CSR.² Although less documented, transcriptional enhancers are present in the Ig λ locus.³ Chromosomal translocations linking oncogenes to these elements are implicated in various B-cell malignancies.^{3–5}

If the deregulation of the translocated oncogene by enhancer elements located in *cis* was extensively studied,^{4,5} little is known about a potential *trans* effect of the Ig enhancers, for example the role of the IgH 3'RR on lymphomagenesis caused by an oncogene

translocation to the IgL locus. Indeed, studies have shown that deletion of the 3'RR modulates the B-cell fate by lowering the BCR signaling,⁶ which is of key importance in B-cell malignancies. We recently studied the impact of the absence of the 3'RR in mice carrying a transgene mimicking the translocation of *c-myc* under the transcriptional control of the Ig λ enhancers.⁷ Our results indicate a wide alteration of B-cell lymphoma phenotypes. While *wt* mice indifferently develop mature or immature lymphomas, 3'RR-deficient mice exhibit a strong preference for immature lymphomas. Furthermore, 3'RR-deficiency leads to a lowered frequency of CD43⁺ activated mature B-cell lymphomas and to an increased frequency of CD5⁺ B-cell lymphomas. Transcription level of the *c-myc* transgene is identical in B-cell lymphomas from *wt* and 3'RR-deficient mice, suggesting that the 3'RR does not directly regulate the expression of the oncogene brought under the control of the Ig λ enhancers.⁷

Two main models are suggested to explain the heterogeneity of B-cell malignancies: the various tumor subtypes may arise from different mutations within the same target B-cell or from the same mutation occurring during different stages of B-cell differentiation. Although these models are not mutually exclusive, our results reinforce the second hypothesis that the same initial oncogenic event occurring in B-cells with different maturity degree can lead to different B-lymphoma subtypes.

Indeed, while *wt* and 3'RR deficient mice bear the same “mini-locus translocation” (*i.e.* *c-myc* under the transcriptional control of Ig λ enhancers), they develop different tumor subtypes. The only difference that could explain this variation is the slightly altered B-cell maturation and the abolition of CSR and SHM in 3'RR-deficient mice. B-cells from both genetic backgrounds over express the *myc* oncogene, but need to accumulate secondary mutations to develop B-cell lymphomas (Fig. 1). Secondary mutations principally occur during the different genetic events that punctuate B-cell ontology. In *wt* B-cells, these oncogenic events can occur either during early step of maturation (*i.e.*, during V(D)J recombination) or during the later stages (*i.e.* during CSR or SHM). CSR and SHM are abrogated in 3'RR-deficient mice,^{1,2} lowering the probability of oncogenic mutations during these later stages of B-cell maturation, hence their increased frequency of immature B-cell lymphomas as compared with *wt* mice.

Taken together (Fig. 1), our results confirm the importance of considering both the cell of origin and the genetic alterations to determine the B-cell lymphoma phenotype and its behavior. Indeed, B-cells bearing the same initial oncogenic events can lead to different B-cell lymphoma subtypes if their development is impaired, while different mutations occurring in the same cell of origin can induce similar tumors.⁴ In this context, we also show that the 3'RR can affect the phenotype of B-cell

*Correspondence to: Yves Denizot; Email: yves.denizot@unilim.fr

Submitted: 04/24/2015; Accepted: 04/28/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1046789>

Comment on: Saad F, et al. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Ig λ Myc mice. *Oncotarget* 2015; PMID:25980500.

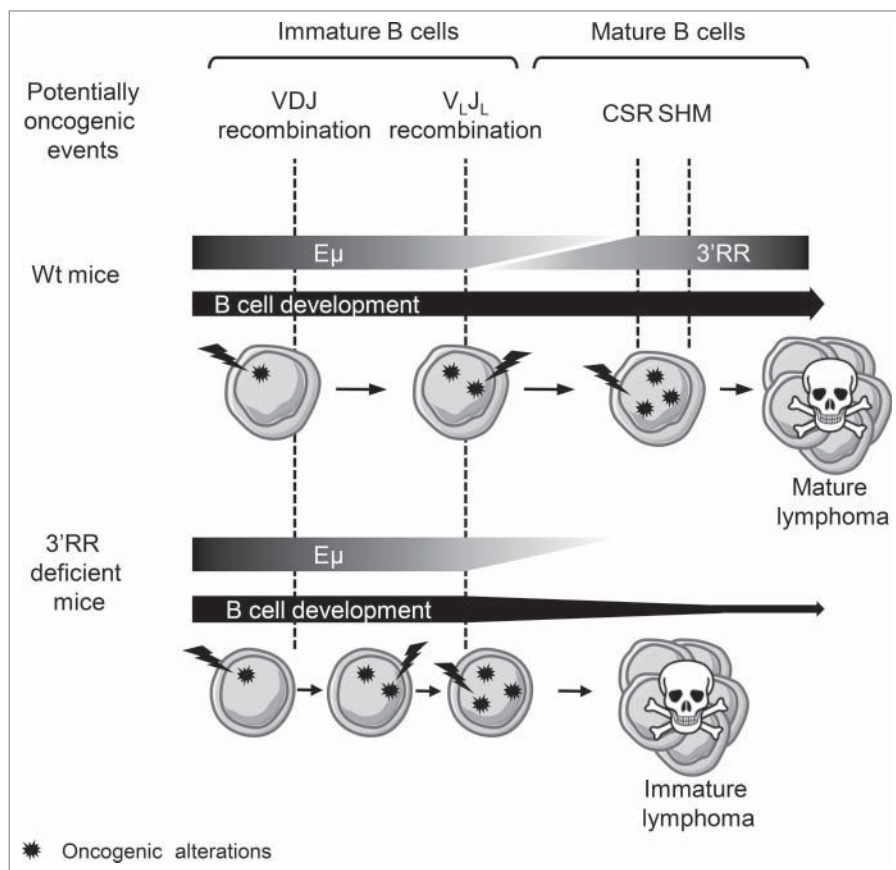


Figure 1. Schematic hypothesis on the implication of the 3'RR in the development of B-cell lymphomas induced by oncogene translocation in IgL locus. While not directly impacting the expression of the translocated oncogene, the absence of the 3'RR modifies B-cell lymphoma phenotypes by impairing the later steps of B-cell ontology.

lymphomas due to oncogene translocation in other loci than the IgH one, by acting on B-cell maturation and regulating potentially oncogenic recombination and mutations during late B-cell differentiation.

References

1. Rouaud P, et al. *J Exp Med* 2013; 21:1501-7; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
2. Vincent-Fabert C, et al. *Blood* 2010; 116:1895-8; PMID:20538806; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
3. Gerbitz A, et al. *Oncogene* 1999; 4:1745-53; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202468>
4. Rouaud P, et al. *Oncotarget* 2012; 3:586-93; PMID:22592113
5. Amin R, et al. *Oncotarget* 2014; 5:8995-9006; PMID:25229630
6. Saintamand A, et al. *Oncotarget* 2015; 6:4845-52; PMID:25980500
7. Saad F, et al. *Oncotarget* 2015; PMID:25742787

Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas

Alexis Saintamand^{†,1}, Armand Garot^{†,1}, Faten Saad¹, Rémi Moulinas², and Yves Denizot^{1,*}

¹Université de Limoges; CRIBL; UMR CNRS 7276; Limoges, France; ²GENOLIM platform; Université de Limoges; Limoges, France

[†]These authors contributed equally.

During the different stages of their development, B lymphocytes undergo several genetic events such as V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) in their immunoglobulin light (IgL) and heavy (IgH) chain loci.¹ Ongoing recombination and mutations make the Ig loci hotspots for oncogene translocation. Indeed, many lymphomas are induced by oncogenes (bcl2, cyclin D1, cyclin D3, c-maf, c-myc. . .) translocations to the Ig loci.² These loci are controlled by *cis*-regulatory elements that regulate both transcription of the Ig genes and induction of the genetic events, making them critical elements in the context of lymphomagenesis.¹ Among them, the most important oncogen-driven *cis*-regulatory elements are the IgH 5'E μ enhancer, the 4 enhancers of the IgH 3' regulatory regions (3'RR), and the E μ enhancer of the Ig κ locus. Although less studied, transcriptional enhancers are also present in the Ig λ locus.³

Animal models demonstrated that translocation of an oncogene under the transcriptional control of one of these enhancers promotes B cell malignancies.^{3–8} However, these translocations are not sufficient to induce transformation since tumors require additional “hits” to develop. The role of the activation-induced cytidine deaminase (AID) that target thousand loci on the B cell genome is suspected.^{2,9} In human mature B cell lymphomas both germinal center-associated genes such as bcl6 and the translocated oncogene bear stigmata of AID targeting.² By using a mouse model (λ -MYC mice)³ mimicking the translocation of a human c-myc under the transcriptional control of mouse Ig λ enhancers we have suggested that these additional hits would be influenced by the 3'RR,^{10,11} through its AID-driven action during SHM,¹² and CSR.¹³ Indeed, λ -MYC-derived lymphomas exhibited a marked reduction of their degree of maturity in a 3'RR-deficient background.¹⁰ To assess this hypothesis we have investigated in our collection of mouse lymphomas the occurrence of SHM in c-myc (both endogenous and translocated) and bcl6 genes, 2 well known AID-targeted genes in human B cell lymphomas.²

We first looked for mutations that could explain the transcriptional burst of the translocated c-myc in λ -MYC mice.¹⁰ Immature (B220⁺CD117⁺) and mature (B220⁺IgM⁺IgD⁺) B cell lymphomas were investigated and compared with pre-malignant mature splenic B cells (B220⁺IgM⁺). Using high throughput sequencing (primers are located in Fig. 1A), we could not find a significant amount of mutation neither in the translocated human c-myc nor in the endogenous mouse c-myc both in immature and mature lymphomas; irrespectively of the presence of a functional 3'RR (Fig. 1B). We next searched for mutations in bcl6, a germinal center associated protein frequently AID-mutated in human B cell lymphomas.² Surprisingly, we found that bcl6 was unmutated in mouse B cell lymphomas (even with a mature phenotype) (Fig. 1B) and that bcl6 transcript levels were dramatically lowered compared to *wt* mature splenic B cell levels (Fig. 1C). The lack of a functional 3'RR did not affect B cell lymphoma bcl6 transcript levels. Taken altogether these results evidenced no AID-induced stigmata in mouse B cell lymphomas. Strengthening this hypothesis, lowered AID transcript levels were found in both immature and mature mouse B cell lymphomas (with or without a 3'RR) as compared to *wt* splenic B cells (Fig. 1D).

The present data indicate that the marked reduction of the degree of maturity in B cell lymphomas of 3'RR-deficient λ -MYC mice is not linked to reduced AID-induced myc and AID-induced bcl6 mutations. The molecular mechanisms controlling this maturity shift remain unclear. Recently, the 3'RR was reported to control μ chain transcription and the B cell fate.¹⁴ Differences in BCR signaling (strength, timing and/or cooperation with accessory molecules) might be suggested to explain the change in lymphoma maturity in 3'RR-deficient mice. Strengthening this hypothesis the class-specific BCR tonic signal was reported to modulate

*Correspondence to: Yves Denizot; Email: yves.denizot@unilim.fr

Submitted: 07/17/2015; Revised: 08/31/2015; Accepted: 09/07/2015

http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1093708

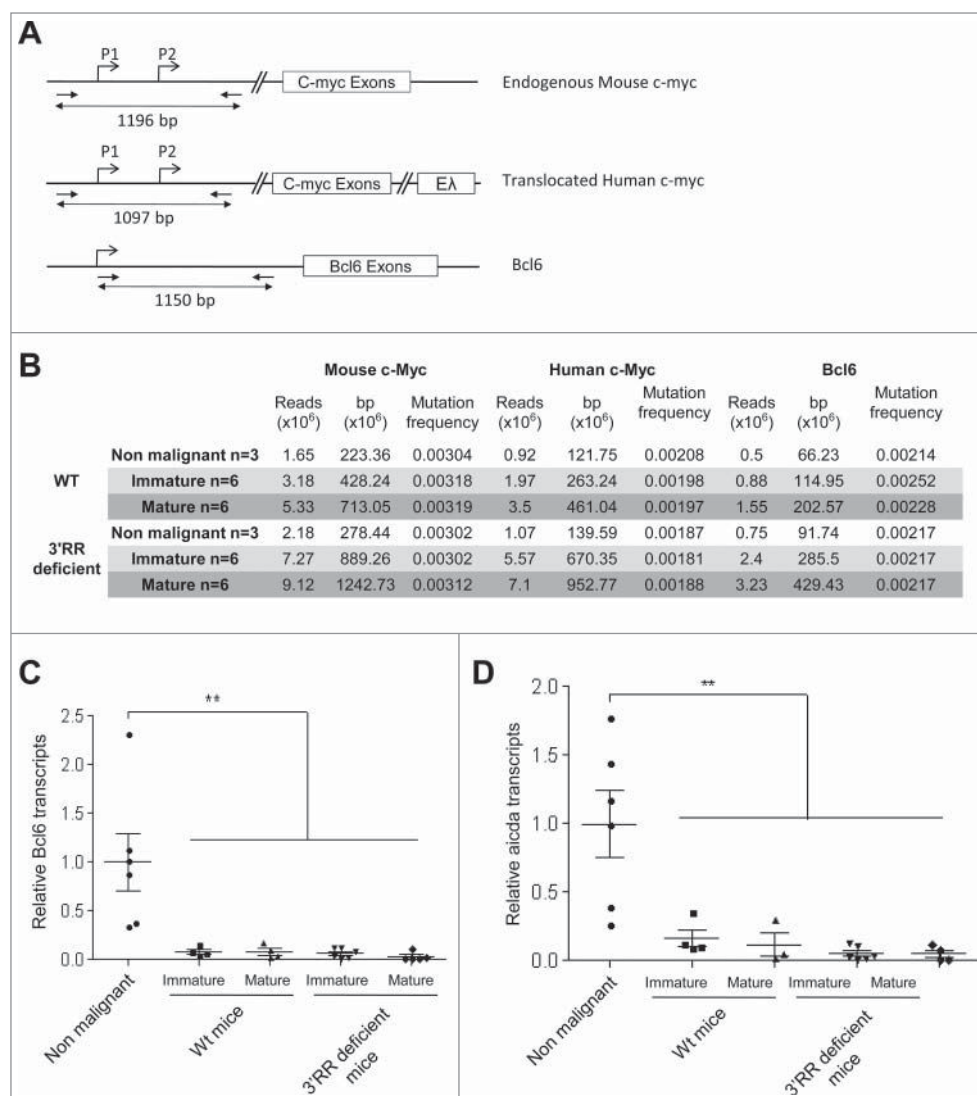


Figure 1. (A) Location of primers for B cell lymphoma sequencing. Mouse Bcl6-for 5'-GGCCGGACACCAGGTGATTAT-3'; Mouse Bcl6-rev 5'-AGGGAGG-GAACTACCGCT GAG-3'; Mouse myc-for 5'-CGGGGGCTCTAGATAACTC-3'; mouse-myc-rev 5'- GACCACCAGATCTGTGCTTA-3'; human myc-for 5'-TAGGCGCGCTAGTAAATTC-3'; human myc-rev 5'-GATATGCGGTCCTACTCCA-3'. Sizes of amplicons are indicated. **(B)** Mutations in mouse Bcl6, mouse myc and human myc in mouse B cell lymphomas. Twelve λ -MYC B cell lymphomas (6 mature and 6 immature lymphomas) and 12 λ -MYC 3'RR-deficient mice B cell lymphomas (6 matures and 6 immature lymphomas) were investigated. After specific amplification (PrimeSTAR Max DNA Polymerase, Takara) and library constructions (Ion Xpress Plus and Ion Plus Fragment Library Kits, life technologies), libraries were sequenced on an Ion Torrent system. n: number of samples. **(C)** Real-time PCR analysis of bcl6 and AID transcripts in mouse B cell lymphomas. Transcripts were analyzed with AID (Mm01184115_m1, Applied Biosystems) and bcl6 (Mm00477633_m1) TaqMan probes on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were normalized to GAPDH transcripts (Mm99999915_g1). For wt λ -MYC mice: 6 immature and 6 mature B cell lymphomas. For λ -MYC 3'RR-deficient mice: 6 immature and 6 mature B cell lymphomas. Non malignant: splenic B cells from 3 pre-malignant λ -MYC mice and 3 pre-malignant λ -MYC mice 3'RR deficient mice. **p < 0.005 (Mann-Whitney U-test).

lymphomagenesis in a *c-myc* deregulation transgenic model.¹⁵ The presence of low AID and *bcl6* transcript levels associated with the previously reported unmutated IgH V gene status of these lymphomas,^{3,9} clearly indicated their pre-germinal center cell origin. Of interest, such a pre-germinal center cell origin has been already postulated for B lymphomas from iMyc^{E μ} mice,⁷ and *c-myc*-3'RR mice.⁴ It is interesting to note that the vast majority of human mature B cell lymphomas arise from a cell with a post-germinal center origin (high *bcl6* and high AID expressions associated with *myc*, *bcl6* and V_H gene mutations).² SHM is suggested to contribute to pathogenesis in human by introducing additional mutations (hits) in key cell cycle regulatory genes. Clearly this tumoral route is difficult to model in mice even with mice bearing mini-locus construction mimicking oncogene translocation to IgH and IgL locus highlighting that the mechanisms of mature lymphoma progression in mice and human should be compared cautiously.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We acknowledge the technological expertise of Emilie Guerin (GENOLIM platform, Limoges University) for high throughput sequencing.

Funding

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze) and “Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud.” A. Saintamand was supported by a grant from Fondation ARC (DOC20150602943).

References

1. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011; 110: 27–70; PMID:21762815; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
2. Robbiani DF, Nussenzweig MC. Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2013; 8: 79–103; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164004>
3. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Tadesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, Gerbitz A, Klobeck G, Hoernagel K, Polack A, et al. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 2000; 192: 1183–90; PMID:11034608; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.8.1183>
4. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol* 2007; 179: 6033–42; PMID:17947677; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6033>
5. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* 2012; 3: 586–93; PMID:22592113; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.474>
6. Wang J, Boxer LM. Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 12766–73; PMID:15687498; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M41-2446200>
7. Zhu D, Qi CF, Morse HC 3rd, Janz S, Stevenson FK. Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse “Burkitt-like” lymphomas from naïve B cells. *Blood* 2005; 105: 2135–7; PMID:15522957; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-07-2573>
8. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, Tae Chung S, Torrey TA, Cheung WC, Polakiewicz RD, et al. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 2005; 65: 1306–5; PMID:15735016; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0268>
9. Laffleur B, et al. AID-induced remodelling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 2014; 15: 1118–31; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.1546>
10. Saad F, Saintamand A, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igl-Myc mice. *Oncotarget* 2015; 6: 20302–11; PMID:25980500; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3963>
11. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis. *Cell Cycle* 2015; 14: 1987–8; PMID:25927676; <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1046789>
12. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med* 2013; 210: 1501–7; PMID:23825188; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
13. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 2010; 116: 1895–8; PMID:20538806; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
14. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, Oblet C, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region governs m chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 2015; 6: 4845–52; PMID:25742787; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3010>
15. Amin R, Marfak A, Pangault C, Oblet C, Chanut A, Tarte K, Denizot Y, Cogné M. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget* 2014; 15: 8995–9006; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2297>

Annexe 2 : Etude du modèle de délétion des trois premiers enhancers

Sequential activation and Distinct functions for Distal and Proximal modules within the IgH 3'RR region

Armand Garot, Marie Marquet, **Alexis Saintamand**, Sébastien Bender, Sandrine Le Noir, Pauline Rouaud, Claire Carrion, Zéliha Oruc, Anne-Gaëlle Bébin, Jeanne Moreau, Kevin Lebrigand, Yves Denizot, Frederick W Alt, Michel Cogné & Eric Pinaud

Accepté pour publication dans PNAS.

Cet article est issu de l'analyse d'un modèle de délétion des trois premiers enhancers de la 3'RR (souris Δ PAL), à laquelle j'ai contribué durant ma thèse. L'essentiel des expériences ont été réalisées par Armand Garot et Marie Marquet, sous la direction d'Eric Pinaud.

Les résultats ont montré que la délétion de l'intégralité du palindrome :

- Provoque la quasi-disparition de la SHM : les souris Δ PAL présentent un taux de mutations proche de celui des souris 3'RR KO.
- Altère la transcription germinale et la CSR vers tous les isotypes sauf IgG2b et IgA.
- Provoque une diminution de la synthèse d'Ig.
- Ne perturbe pas le développement lymphocytaire B et la répartition des sous populations cellulaires.

Ces résultats, couplés à ceux obtenus précédemment notamment dans les souris 3'RR KO, Δ hs3b/hs4 et Δ hs4, ont permis de préciser le rôle de chaque *enhancer* de la 3'RR et de suggérer la séparation de la 3'RR en deux "blocs fonctionnels", comme évoqué précédemment dans la discussion.

Sequential activation and distinct functions for distal and proximal modules within the IgH 3' regulatory region

Armand Garot^{a,1}, Marie Marquet^{a,b,1}, Alexis Saintamand^a, Sébastien Bender^{a,c}, Sandrine Le Noir^a, Pauline Rouaud^{a,2}, Claire Carrion^a, Zéliha Oruc^a, Anne-Gaëlle Bébin^{a,3}, Jeanne Moreau^a, Kevin Lebrigand^d, Yves Denizot^a, Frederick W. Alt^{e,f}, Michel Cogné^{a,g}, and Eric Pinaud^{a,4}

^aContrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations, UMR 7276, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, 87025 Limoges, France; ^bService de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, F-87042 Limoges, France; ^cCentre de Référence des Amyloses, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, F-87042 Limoges, France; ^dUniversité Nice Sophia Antipolis, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France; ^eProgram in Cellular and Molecular Medicine, Howard Hughes Medical Institute, Boston, MA 02115; ^fDepartment of Genetics, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115; and ^gInstitut Universitaire de France, Université de Limoges, 87000 Limoges, France

Edited by Tasuku Honjo, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, and approved January 6, 2016 (received for review July 23, 2015)

As a master regulator of functional Ig heavy chain (IgH) expression, the IgH 3' regulatory region (3'RR) controls multiple transcription events at various stages of B-cell ontogeny, from newly formed B cells until the ultimate plasma cell stage. The IgH 3'RR plays a pivotal role in early B-cell receptor expression, germ-line transcription preceding class switch recombination, interactions between targeted switch (S) regions, variable region transcription before somatic hypermutation, and antibody heavy chain production, but the functional ranking of its different elements is still inaccurate, especially that of its evolutionarily conserved quasi-palindromic structure. By comparing relevant previous knockout (KO) mouse models (3'RR KO and *hs3b-4* KO) to a novel mutant devoid of the 3'RR quasi-palindromic region (3'PAL KO), we pinpointed common features and differences that specify two distinct regulatory entities acting sequentially during B-cell ontogeny. Independently of exogenous antigens, the 3'RR distal part, including *hs4*, fine-tuned B-cell receptor expression in newly formed and naïve B-cell subsets. At mature stages, the 3'RR portion including the quasi-palindrome dictated antigen-dependent locus remodeling (global somatic hypermutation and class switch recombination to major isotypes) in activated B cells and antibody production in plasma cells.

immunoglobulin gene regulation | enhancers | B-cell development

Immunoglobulin heavy chain (IgH) expression is critical for B-cell development and survival. In developing B-lineage cells, accessibility to the major remodeling events [VDJ recombination, somatic hypermutation (SHM), class switch recombination (CSR), and locus suicide recombination] depends on epigenetic changes and germ-line transcription of many regions, including V_H promoters, *I*/switch region promoters, *cis*-regulatory region enhancers, and chromatin insulators (1–3). A focus on knockout (KO) models for IgH *cis*-regulatory regions (enhancers and chromatin insulators) is a means to simplify the regulation picture. At the preproB stage, the IgH locus undergoes long-range looping in a “rosette-like” structure that brings into close proximity major IgH regulatory regions, such as the V_H to D_H intergenic control regions (*IGCR1* and -2), the $E\mu$ intronic enhancer, the 3' regulatory region (3'RR), and the 3'IgH CTCF-binding elements (*CBEs*) (4–6). Initiation of VDJ recombination is assisted by the $E\mu$ enhancer, which provides efficient transcription and accessibility to initiate D_H to J_H rearrangements (7–10), as well as the *IGCR1* and -2 elements that ordinate the V_H to DJ_H second recombination step (5, 11–13). Devoid of enhancer activity (14, 15), 3'*CBE* (*hs5* to *hs8*) likely participate in IgH folding before VDJ recombination because deletion of *hs5* to -7 only impacts use of proximal V_H regions (16). In pre-B cells, once a functional H chain is expressed as a component of the pre-B-cell receptor (BCR), the $E\mu$ enhancer function switches from DJ_H region accessibility to Ig μ chain expression, and consequently modulates

pre-BCR expression and expansion of the pre-B-cell compartment (17, 18). The activity of $E\mu$ even extends to the newly formed (NF)/immature stage, where it tunes BCR expression and influences B-cell fate (18). The 3'RR has been proven to be dispensable for locus contraction and VDJ recombination (19, 20). Its transcriptional activity starts after the pre-B stage and continues throughout B-cell development (21). The large window of activity of the 3'RR implies that its regulatory function shifts sequentially to modulate the expression of functional H chains (in BCR-expressing cells or plasma cells), the production of germ-line regulatory transcripts correlated with Ag-dependent remodeling events, such as CSR, SHM (for review, see ref. 1), or even suicide recombination (3). The multiple KO and transgenic models developed to study 3'RR function (21) have brought considerable information, although quite puzzling, given that models have been mostly studied individually. Transgenic models carrying bacterial artificial chromosomes prohibit B-cell development and chromatin studies but provided information on CSR and SHM (22).

Significance

The immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region (3'RR) fine-tunes IgH gene expression during B cell development. One singularity of this region is its quasi-palindromic structure conserved in the 3'RR of other species. By comparing previous mouse knockout (KO) models (3'RR- and *hs3b-4* KO) to a novel mutant devoid of the quasi-palindrome (3'PAL KO), we highlighted common features and differences that specify two distinct regulatory entities: (i) the distal module (*hs4*) is sufficient for normal IgH expression up to the naïve B cell stage; (ii) during B-cell activation, the proximal module (quasi-palindrome) is important for both class switch recombination and somatic hypermutation; and (iii) in plasma cells, the quasi-palindrome is required for robust transcription of the IgH locus.

Author contributions: A.G., M.M., A.-G.B., F.W.A., M.C., and E.P. designed research; A.G., M.M., A.S., S.B., S.L.N., P.R., C.C., A.-G.B., and E.P. performed research; A.G., M.M., A.S., S.B., C.C., Z.O., K.L., Y.D., and E.P. contributed new reagents/analytic tools; A.G., M.M., A.S., S.L.N., P.R., C.C., K.L., F.W.A., M.C., and E.P. analyzed data; and A.G., M.M., A.S., J.M., M.C., and E.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE76217).

¹A.G. and M.M. contributed equally to this work.

²Present address: SILAB R&D, 19240 Saint-Viance, France.

³Present address: Center for Vaccine and Immunology, University of Georgia, Athens, GA 30602.

⁴To whom correspondence should be addressed. Email: eric.pinaud@unilim.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1514090113/-DCSupplemental.

Taking CSR into account, bacterial artificial chromosome transgene studies point out a cumulative activity of *IgH* 3' enhancer elements, with special activities for some of them, such as *hs1-2*, *hs4* alone or combined with *hs3b* (23, 24), and on the other hand, exonerate any effect of the *hs3* homologs (25). Transgenic models contradict endogenous deletion studies with regards to BCR expression and antibody secretion (23). From endogenous deletion models, we learned that 3'RR enhancers share redundant functions because individual KO mice had no significant consequences on B-cell remodeling events (26–28), whereas combined deletion of *hs3b* and *hs4* decreased CSR to all isotypes, except for IgG1 (29). The entire 3'RR deletion demonstrates the potency of the region at all steps: deficient mice cumulate BCR-expression defects (30), global SHM defects (31), abrogated CSR, and failure to secrete Igs (32).

Another singularity of the 3'RR is its quasi-palindromic structure centered around *hs1-2*, composed of inverted repeats for about 25 kb and terminating by virtually identical *hs3a* and *hs3b* enhancers in the mouse (33, 34). A similar quasi-palindromic organization is conserved in the 3'RR of other species, including humans and apes (3, 35, 36). Strikingly, evolution did not conserve virtual homology of 3'RR inverted regions but preserved its global structure. Such a selection implies a dedicated function for the 3'RR quasi-palindrome that has not yet been elucidated. Our present study describes and compares a new KO mouse model devoid of the quasi-palindromic 3'RR proximal module (3'PAL KO) to relevant models (Fig. 1) lacking the distal module (*hs3b-4* KO) (29) or the entire region (3'RR KO) (32). Common features and differences raised by this side-by-side comparison reveal that the 3'RR is composed of two functional entities that activate sequentially during B-cell development.

Results

Deletion of the Proximal *IgH* 3'RR Module in the Mouse. To determine the role of the “proximal 3'RR structural module” (Fig. 1) (called “3'PAL” for *IgH* 3' quasi-palindromic region), we introduced a *loxP-pTK-neo^R-loxP* cassette in place of the 26.4-kb region that includes *hs3a*, *hs1-2*, and *hs3b* enhancers by homologous recombination into 129/Ola ES cells (Fig. S1A). Once introduced into the mouse germ line, the selection cassette was deleted, as described previously (18), to get the 3'PAL^Δ model (Fig. S1B). Our study used either homozygous mutant mice (of mixed background, predominantly 129) or F1 heterozygous mice obtained after breeding to wt C57BL/6 mice. We compared 3'PAL deletion to previous models devoid of the two distal *IgH* enhancers (*hs3b-4*) (29) or the entire 3'RR (3'RR^Δ) (32).

The Distal 3'RR Module (*hs4*) Is Sufficient for Antigen-Independent B-Cell Ontogeny (from PreproB to Naïve B Cells). Because the *hs4* enhancer remains upon our 3'PAL deletion, this mouse KO strain is a model of choice to evaluate the function of the 3'RR distal module in developing B cells. To avoid any disparity linked to the murine genetic background (30, 37), the antigen-independent phase of B-cell development was assessed in mouse models carrying

IgH alleles of distinct allotypes. In such models, IgM-allotype expression in developing B-lineage cells reflects competition between the “b” allotype *IgH* wt allele (from C57BL/6 mice) and the “a” allotype *IgH* mutant allele (from 129 mice). We compared bone marrow and spleen B-lineage cell subsets of wt F1 mice (*IgH^{wt/a}*) to models carrying heterozygous deletions of the *IgH* 3'RR modules: proximal module (this study, 3'PAL^{Δa/wtb}), distal *hs3b* and *hs4* elements (*hs3b-4^{Δa/wtb}*), and the complete 3'RR (3'RR^{Δa/wtb}). We combined surface staining with intracellular IgM-allotype staining to precisely determine, in each relevant cell subset, both the proportion (and the resulting ratio) of IgM^a or IgM^b-expressing cells and the mean fluorescence of each IgM-allotype (and its ratio). Disruption of part or the entire 3'RR did not compromise early B-cell development because all four models displayed similar numbers and proportions of IgM^a- or IgM^b-expressing cells in the bone marrow NF/immature B-cell subset (Fig. 2, Fig. S2, and Table S1). Even though a slight decrease in expression of the mutated allele (IgM^a) had already been seen in NF B cells from 3'RR^{Δa/wtb} and *hs3b-4^{Δa/wtb}* animals (Fig. 2), this had no consequence on the inflow of NF B cells. Deletion of the proximal 3'RR module had no effect on developing B-lineage cells: 3'PAL^{Δa/wtb} animals displayed normal numbers and proportions of all bone marrow and spleen B-cell subsets (Fig. S2), most likely the consequence of normal IgM^a heavy chain expression in these cells (Fig. 2). This theory was confirmed in homozygous 3'PAL^{Δ/Δ} mice harboring B-cell compartments comparable to wt mice (Table S2).

The Distal 3'RR Module (*hs4*) Is Required for Efficient BCR Expression in Transitional B Cells. Deletion of the proximal 3'RR module strongly contrasted with 3'RR-deletions that encompass the distal *hs4* element: in the spleen of 3'RR^{Δa/wtb} and *hs3b-4^{Δa/wtb}* animals, numbers and proportions of splenic transitional B cells expressing IgM^a allele was decreased (Fig. 2, Fig. S2, and Table S1). This disadvantage in the generation of transitional B cells was correlated with decreased expression (about twofold compared with wt cells, as evaluated by mean fluorescence intensity) of the IgM^a mutated allele (Fig. 2). This result was associated with a decrease in numbers and proportions of IgM^a-expressing mature B-lineage cells: marginal zone (MZ) and follicular (FO) B cells from the spleen, mature recirculating B cells in the bone marrow, and B1 cell subsets in the peritoneal cavity in 3'RR^{Δa/wtb} and *hs3b-4^{Δa/wtb}* animals (Fig. 2, Fig. S2, and Table S1). Deletion of either proximal, distal, or the entire 3'RR showed marked differences on Ig heavy chain expression in developing B cells. A locus devoid of the distal module (3'RR^Δ and *hs3b-4^Δ*) failed to express a normal amount of surface Igμ heavy chain (already observed in NF B cells) with drastic consequences on the capacity to generate mature naïve B-cell subsets. On the other hand, our 3'PAL KO model proved that the *hs4* enhancer was per se sufficient to drive efficient expression of μ heavy chain in developing B cells.

The Proximal 3'RR Module Drives Germ-Line Transcription and CSR to $\gamma 1$, $\gamma 3$, and $\gamma 2a$ Genes. Global *IgH* locus transcriptional activation was assessed by comparing RNA-seq data obtained from resting and in vitro LPS-activated splenic B cells from wt and homozygous 3'PAL, *hs3b-4*, and 3'RR KO animals. If sense and antisense germ-line transcripts (GLT) for the whole locus were above background in 3'RR KO B cells, deletions of distal and proximal 3'RR modules led to intermediate levels of *IgH* GLT upon LPS activation (Fig. 3 and Fig. S3). Compared with wt cells, induction of sense GLT in the $\gamma 3$ region was decreased in all KO models, whereas GLT of the μ region was not affected by *hs3b-4* deletion. In contrast, $\gamma 2b$ region GLT were still normally induced in 3'PAL-deficient B cells (Fig. 3). To more precisely evaluate the function of the proximal 3'RR on CSR, splenic B cells from wt and homozygous 3'PAL KO mice were subjected to appropriate in vitro stimulations and tested for switched BCR expression and GLT (Fig. S4 A and B). B cells deficient for the quasi-palindrome displayed a significant CSR defect to IgG3, IgG1, and IgG2a isotypes (reduced by two- to threefold). This finding was correlated with a consistent defect in GLT of both

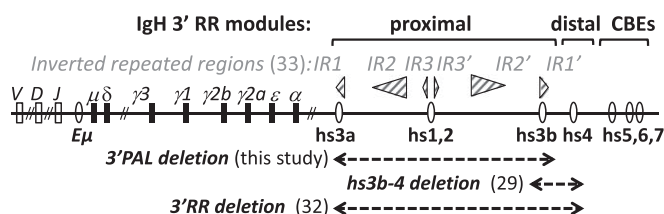


Fig. 1. The *IgH* 3'RR: structure and KO mouse models. Mouse *IgH* locus showing details of genomic regions across the 3'RR. Horizontal triangles represent inverted repeated regions forming a quasi-palindrome. Deletions carried out in the mouse models used for the study are indicated (see introductory paragraphs for details).

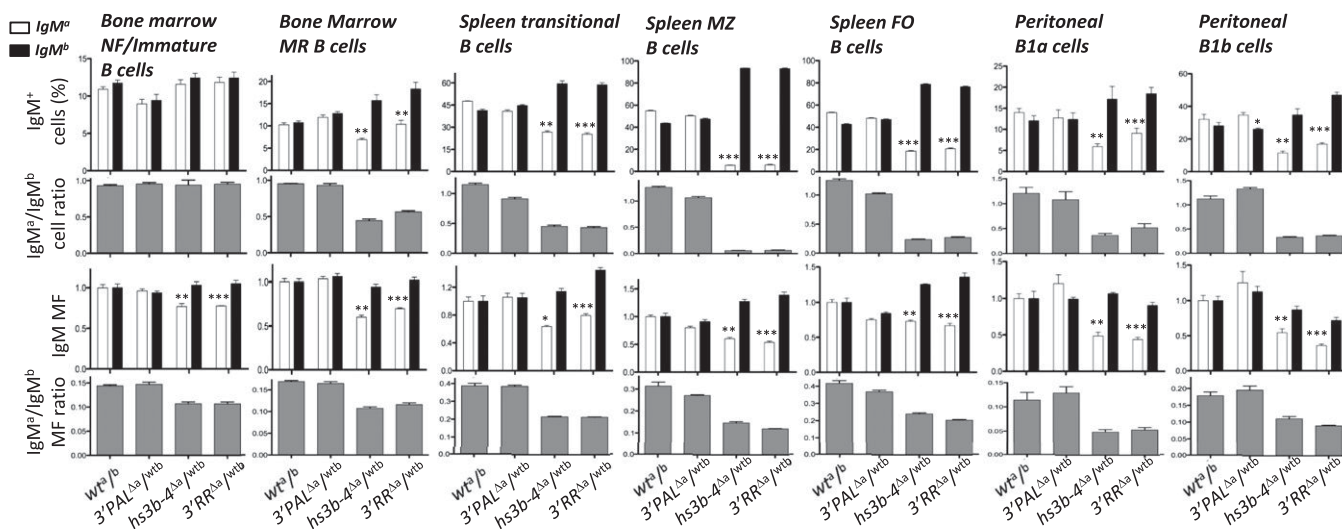


Fig. 2. Normal IgM-expressing naïve B-cell subsets require the 3'RR distal module. B-lineage cell subsets in heterozygous models: $wt^{a/b}$, $3'PAL^{\Delta a/wt^b}$, $hs3b-4^{\Delta a/wt^b}$, and $3'RR^{\Delta a/wt^b}$. Bone marrow NF/immature and mature recirculating (MR) B cells; spleen transitional, MZ, and FO B cells; peritoneal cavity B1a and B1b subsets were analyzed by flow cytometry as described in Fig. S2. Top histograms display percentages of IgM^a (white) or IgM^b (black) expressing cells; gray histograms below reported the corresponding ratio. Bottom histograms give intracellular IgM^a or IgM^b allotype mean fluorescence (MF), gray histograms below report the corresponding MF ratio. Cell numbers were collected from five to seven animals of each genotype. Significant differences were indicated by *P* values: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 according to the Mann-Whitney *u* test.

donor and acceptor switch regions (Fig. S4A) in $3'PAL^{\Delta/\Delta}$: $I\gamma 3$ - $C\gamma 3$ GLT was reduced by fivefold; $I\mu$ - $C\mu$, $I\gamma 1$ - $C\gamma 1$, and $I\gamma 2a$ - $C\gamma 2a$ GLT were reduced by threefold. In contrast to complete 3'RR deletion (32), in vitro CSR to IgG2b and IgA was not significantly reduced by the deletion of the proximal 3'RR region (Fig. S4B) and their corresponding germ-line transcripts were detected in almost normal proportions in stimulated $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ B cells (Fig. S4A and B). Decreased Ig secretion of all isotypes in supernatants of $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ -stimulated cells (Fig. S4C) was a feature shared with the 3'RR deletion, suggesting, beyond an isotype-specific CSR defect, a global Ig secretion defect (Discussion). As potential targets of the IgH 3'RR, we determined expression of the recently described long-noncoding RNA (lncRNA) associated with CSR (38) and found, based on RNA-seq, no variation in all models in resting or LPS-activated B cells (Fig. 3). This finding was confirmed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) experiments showing that *wt* and $3'PAL$ -deficient B cells (resting or stimulated) displayed same amounts of lncRNA-CSR transcripts (Fig. S4D).

The Proximal 3'RR Module Controls SHM in a Transcription-Dependent Manner. SHM was assayed in GC B cells ($B220^{+}/PNA^{High}/FAS^{+}$) sorted from Peyer's patches of *wt* and homozygous $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ animals. At the *IgH* locus, SHM frequency in the ~500-bp intronic regions downstream from rearranged- J_H3 or J_H4 segments was reduced by threefold in $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ GC B cells (0.005 mutations per base pair) compared with *wt* (0.014 mutations per base pair) (Fig. 4A). When comparing the distribution of mutated sequences, we found that $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ GC B cells were largely unmutated (72%), whereas *wt* control had only a small proportion (7%) of unmutated cells (Fig. 4A). Mutated *IgH* alleles from GC B cells devoid of the proximal module contained only few mutations (27% of sequences, with fewer than six substitutions). Similarly to the whole 3'RR deletion (31), highly mutated *IgH* alleles (>six mutations) were almost absent in our $3'PAL$ mutants (Fig. 4A). As a control experiment, SHM was also quantified in the intron downstream from the J_K5 segment and found both the mutation frequency and the percentage of mutated sequences to be comparable with that in *wt* (Fig. 4A). We finally quantified *IgH* primary transcription by qRT-PCR with a probe downstream from the J_H4 intron and found a two- to threefold reduction in GC B cells lacking the proximal module (Fig. 4B). In naïve B cells ($B220^{+}/PNA^{low}/FAS^{+}$) sorted from Peyer's patches, *IgH* primary transcription levels were similar

in *wt* and $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ mice, confirming that the 3'RR proximal module did not modulate heavy chain expression in resting B cells.

Plasma Cell Antibody Production and the Antigen-Specific Responses Rely on the 3'RR Proximal Module. The first evidence of Ig secretion defects in animals lacking the 3'RR distal module was the drastic reduction of all circulating Ig, including IgM, in the serum of $3'PAL^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. S5A). This hypogammaglobulinemia was similar to that previously observed in 3'RR KO mice (32). When challenged with ovalbumin, heterozygous $3'PAL^{\Delta a/wt^b}$ mutants proved that a deficient allele was unable to support efficient antibody production (Fig. S5B). The IgM^a-specific response was consistently decreased (Fig. S5B), whereas IgG1^a and IgG2a^a responses were completely abrogated (Fig. S5B), probably the consequence of combined CSR and Ig secretion defects. Plasma cell differentiation and ability to produce Ig was then evaluated in heterozygous mice after intraperitoneal challenge with sheep red blood cells. All models showed efficient generation of plasma cells expressing both IgM^a and IgM^b allotypes in the spleen 6 d after challenge (Fig. 4C). Remarkably, plasma cells carrying *IgH* alleles devoid of the proximal module ($3'PAL^{\Delta}$ and $3'RR^{\Delta}$ alleles) exhibited a strong defect in intracellular IgM expression (Fig. 4D). To look for the origin of the defect, *IgH* transcription was assayed in resting and in vitro-activated B cells from homozygous $3'PAL$ KO mice. In this plasmablast-enriched population, both the *IgH* primary and the secreted form of the μ chain transcripts were drastically reduced in the absence of the proximal module (Fig. 4E).

Discussion

There is no doubt that the 3'RR plays a key role in *IgH* locus regulation (39) but the role of the conserved quasi-palindrome and the hierarchy between the modules remained poorly understood. By comparing relevant KO mouse models, our study demonstrated that the 3'RR includes at least two functional modules: (i) the distal module, which includes the *hs4* enhancer element; and (ii) the proximal module, defined as the 3'RR quasi-palindrome. First, independently of antigen stimuli, we confirmed that VDJ recombination does not require any of the 3'RR enhancers. In all models, early B-cell development was preserved, with normal pro- and pre-B-cell compartments. This finding correlates with studies proving normal VDJ rearrangements and V_H use in such models (19, 40). Second, our study identifies the

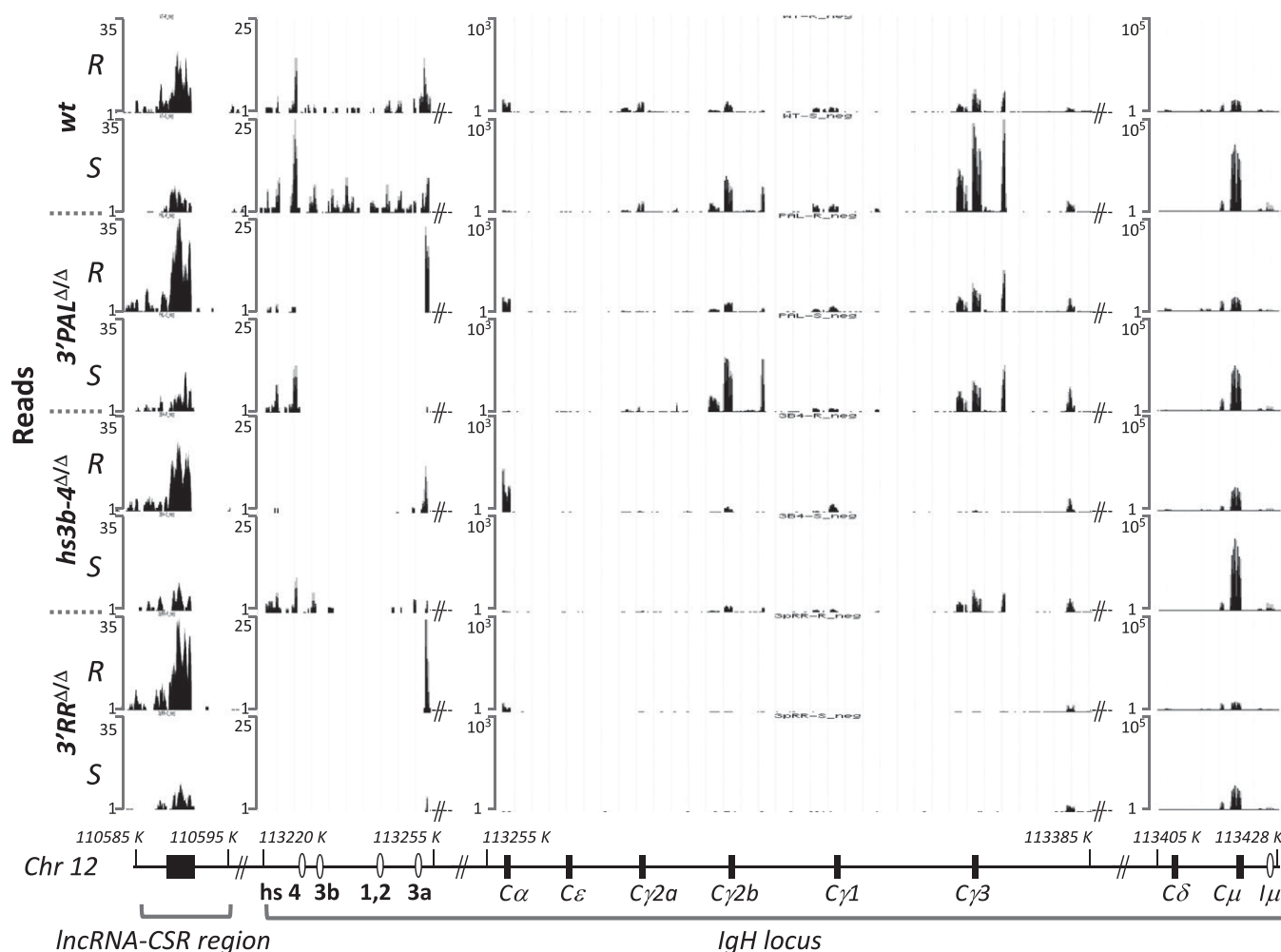


Fig. 3. Variegated induction of *IgH*-associated transcripts upon *3'RR* deletions. Expression of sense transcripts at the *IgH* locus based on RNA-seq read distribution in resting B cells sorted from the spleen (R) and LPS-activated B cells for 48 h (S) from *wt*, *3'PAL* Δ/Δ , *hs3b-4* Δ/Δ , and *3'RR* Δ/Δ mice. Each RNA-seq experiment was performed on a pool of equivalent numbers of B cells sorted from four age-matched animals of the same genotype. Reads were aligned on mouse GRCm38/mm10 assembly using University of California, Santa Cruz Genome Browser (49), base position on mouse Chr12 are reported. A map of the *IgH* locus (not to scale), including constant genes, regulatory elements, and orientation of the reported transcripts is indicated.

critical role of the distal *3'RR* module for Ig heavy chain expression in a defined window starting as soon as a complete BCR is expressed (NF B cells) and extending until the naïve B-cell stage. In B-lineage precursors, a first contribution was assigned to CBEs, which have been proposed to facilitate interactions between locus distant regions (14, 20, 41, 42). Deletion of *hs5-7* CBEs downstream from the mouse *3'RR* resulted in only a slight modification of *D* and *V_H* use (16), suggesting a modest contribution of *3'* CBEs in VDJ joining, although it is not excluded that full deletion (including *hs8*) might have a more drastic effect (39). Once VDJ recombination is completed, the *3'RR* and the promoter of the VDJ-rearranged segment continue to interact and then starts the actual *3'RR* stepwise transcriptional activation by its distal module. Indeed, when developing B cells were driven by *IgH* alleles lacking the *hs4* distal enhancer (*hs3b-4* Δ/Δ or *3'RR* Δ/Δ), a progressive decrease in μ H-chain expression was already observed in NF B cells (about 30% decrease at this stage compared with *wt*, based on *IgM^a/IgM^b* mean fluorescence ratio) and rose to a 50% decrease in transitional B cells. Such “low BCR-expressing” NF and transitional B cells displayed a differentiation disadvantage (observed in both models devoid of *hs4*) toward mature MZ and FO B-cell subsets. In the *3'PAL* KO model, normal *Igμ* expression in bone marrow NF B cells and spleen mature B subsets clearly shows the proximal *3'RR* module as dispensable at these stages.

These findings pinpoint the window of activity for the distal module and support a stepwise activation of the *IgH 3'RR*: *hs4* is required to maintain optimal μ heavy chain transcription from the NF bone marrow to the mature MZ and FO splenic B cells. This window of activity clearly overlaps with that of *Eμ*, recently described as active on μ H-chain transcription from pre-B to transitional B-cell stages (18).

When mature B cells encounter antigen and engage in an immune response, the *3'RR* proximal module takes over most of *IgH* locus regulatory mechanisms: SHM, CSR, and antibody production. First, SHM seems strongly dependent on the proximal module. The drastic reduction in SHM frequency in germinal center (GC) B cells from *3'PAL* Δ/Δ mice (0.005 mutations per base pair downstream from the *J_H* introns, excluding unmutated sequences) was similar to that observed in *3'RR*-deficient animals (31), a model described as deficient for recruiting activation-induced cytidine deaminase (AID) in *IgH* variable regions (43). In our *3'PAL* Δ mice, the SHM defect was also correlated with a decrease (at least twofold) in *IgH* primary transcription, a defect comparable to that seen in *3'RR*-deficient mice (31). The *IgH* transcription defect in *3'PAL*-deficient GC B cells also provides further evidence that *hs4* does not influence H-chain expression once B cells are activated. Even if such a twofold transcription decrease appears modest, it is certainly significant.

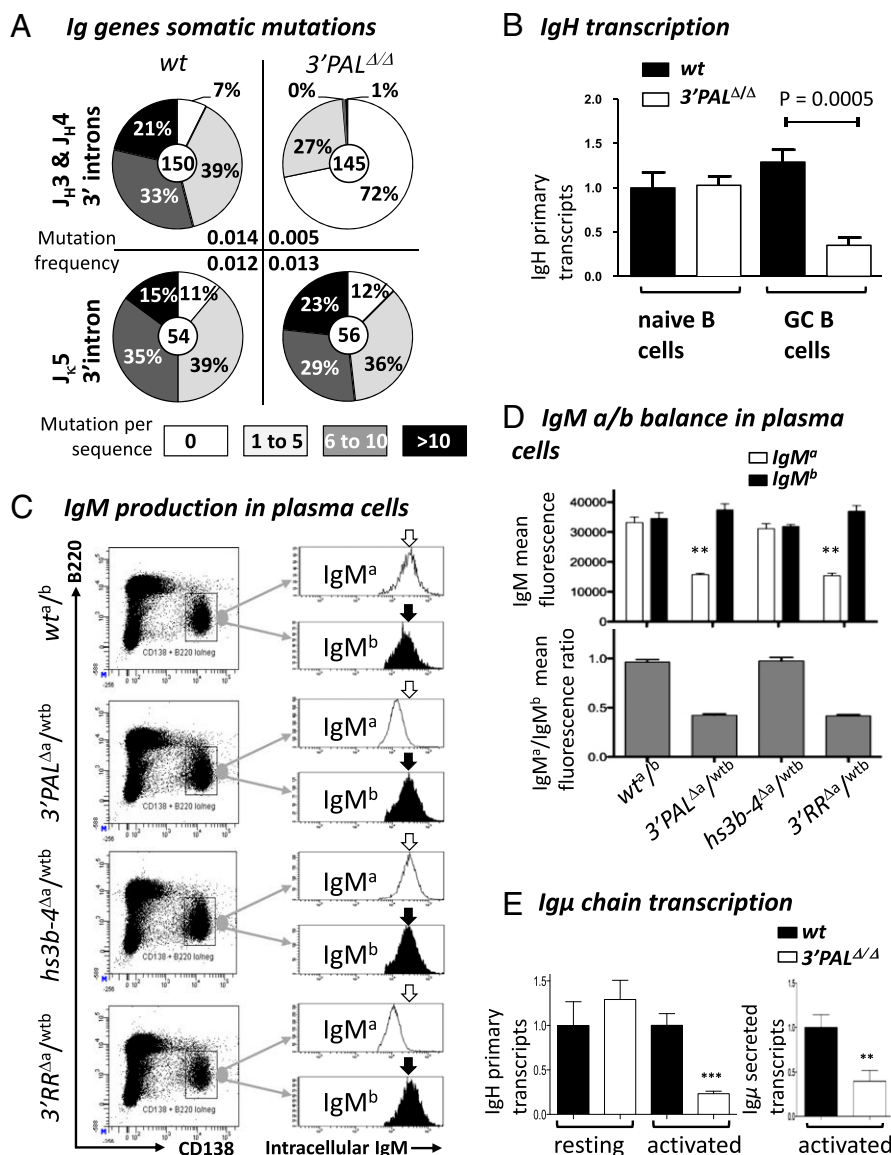


Fig. 4. Proximal 3'RR module controls IgH somatic mutations in GC B cells and Ig production in plasma cells. (A) GC B-cell DNA was isolated from B220⁺ PNA^{high}/FAS^{high} Peyer's patch cells from unimmunized 8-wk-old wt and 3'PAL KO mice. Pie plots showed the percentage of mutated clones for each group (proportional to the area in each slice). Total number of clones analyzed for each genotype was noted in the center. Mutation frequency (mutation per base pair, indicated for each group) was calculated from sequences that contained at least one mutation; clonally related sequences were excluded. (B) Relative IgH primary transcripts was estimated by qRT-PCR, performed using IgH^{WT} TaqMan probe and normalized to Cd79a transcripts (see Table S3 for details). (C) Intracellular IgM-allotype expression in plasma cells from heterozygous mouse models (wt^{a/b}; 3'PAL^{Δa/wtb}, hs3b-4^{Δa/wtb}, and 3'RR^{Δa/wtb}) was measured by FACS analysis. After sheep red blood cell challenge, plasma cells from the spleen were gated based on surface expression of B220^{low} and CD138⁺. This specific population was assayed for intracellular expression of IgM^a or IgM^b allotypes. One representative experiment is shown. (D) Upper histogram shows mean fluorescence of intracellular IgM^a (white) or IgM^b (black) allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in plasma cells collected from at least five animals of each genotype. Gray histograms below report the corresponding MF IgM^a/IgM^b ratio. (E) IgH primary and secreted-Igμ transcripts in wt and 3'PAL^{Δ/Δ} B cells. (Left) Primary transcription of rearranged IgV_H regions (normalized to Gapdh transcripts) was quantified by qRT-PCR in CD43⁺ resting B cells from wt and 3'PAL^{Δ/Δ} animals. (Right) Transcription of the secreted form of Igμ heavy chain was quantified by qRT-PCR (see Table S3 for details). Significant differences were indicated by P values: **P < 0.01, ***P < 0.001 according to the Mann-Whitney u test.

Indeed, it is admitted that the level of BCR expression modulates B-cell fate and that a basal level of H-chain transcription is necessary for B-cell survival (44). Besides a similar transcription defect in both models, the proportion of unmutated sequences (72%) in 3'PAL-deficient GC B cells was, however, lower than in 3'RR-KO mice (95%) (31). Even if *hs4* does not impact transcription at this stage, its partnership with the 3'PAL module for AID recruitment or targeting can be suspected in light of the higher proportion of unmutated IgH alleles in 3'RR KO than in 3'PAL-deficient mice. Second, germ-line transcription of major switch regions is regulated by the proximal 3'RR module. Transcription of the donor Sμ region is decreased by at least threefold in 3'PAL-deficient B cells induced for CSR in vitro (32, 45); the same is true for GLT of *Sy3*, *Sy1*, and *Sy2a* acceptor switch regions, two features shared with the 3'RR-KO model (32). The failure of a 3'PAL-deficient allele to support IgG1- or IgG2a-specific responses is also consistent with a CSR defect. Interestingly, the 3'PAL^{Δ/Δ} phenotype preserved normal GLT and CSR to IgG2b and IgA, whereas these processes were affected in animals lacking both *hs3b* and *hs4* enhancers or the entire 3'RR (29, 32). Specifying that *hs4* is by itself sufficient for normal GLT and CSR to *Cy2b* and *Cα*, our study underlined the complexity of constant gene transcriptional regulation for CSR.

Among potential regulatory mechanisms involving the 3'RR, the lncRNA for CSR, recently described in the CH12 cell line undergoing CSR to IgA, promotes the CSR-stimulating activity of the 3'RR via a long-distance interaction with the *hs4* region (38). It is possible that lncRNA-CSR (normally expressed in 3'PAL-deficient B cells), promotes efficient CSR to IgA and IgG2b in this model that conserved the *hs4* module. Third, in plasma cells, the common feature shared by both 3'RR and 3'PAL deletions proved that Ig heavy chain transcription and antibody production are directly under the control of the 3'RR proximal module.

We hypothesize that IgH 3'RR modules respond sequentially maybe independently to external stimuli: (i) the distal (*hs4*) module being responsible for efficient heavy chain and BCR expression in NF and naïve B-cell subsets, and (ii) the proximal quasi-palindromic module being later activated by exogenous antigen stimulation to support both SHM, CSR (with some help from *hs4* in the situation of *Sy2b* and *Sα* CSR), and prolonged IgH overexpression in antibody secreting cells.

Materials and Methods

Flow Cytometry. Once isolated from mouse organs, single-cell suspensions of bone marrow, spleen, peritoneal cavity, and Peyer's patches were labeled

with various fluorescent antibodies, as detailed in *SI Materials and Methods*. To collect plasma cells, mice were injected with 200 μ L sheep red blood cell suspension (bioMérieux) in the peritoneal cavity. At day 6, mice were killed and splenic plasma cells analyzed by flow cytometry as described in *SI Materials and Methods*. All animal experiments were performed according to the guidelines of the Comité Régional d'Éthique du Limousin (CREAAL 7-07-2012 approved protocol).

RNA Isolation and qRT-PCR. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed as described previously (18). TaqMan probes and primers, previously described in (9, 31, 38, 46–48), are listed in Table S3. Relative mRNA levels were normalized to *Gapdh* or *Cd79a* transcripts.

RNA-Seq Analysis. RNA-seq libraries were prepared from a pool of equivalent numbers of B-purified B cells, either resting B cells from the spleen or in vitro-activated B cells for 48 h with LPS, from four animals of each genotype. Sequencing and analysis are described in *SI Materials and Methods*.

SHM. The experimental procedures for Peyer's patch GC and naïve B cells sorting, genomic extraction, amplification, and cloning have been previously reported (9). Amplification of *VDJ_H*- or *VJ_K*-rearranged DNA fragments was

performed with the appropriate primers (Table S3). Mutational analysis was performed in either the 500-bp intronic region just downstream from *J_{H3}* and *J_{H4}* segments (for IgH locus) or in the 554-bp intronic region located downstream from the *J_{K5}* segment (for Igk locus).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank all members of the Service Commun d'Animalerie and Plateforme de Transgénese de Limoges University for mouse work; Catherine Ouk-Martin and the FACS sorting facility of Limoges University; Drs. Laurent Delpy, Christophe Sirac, and Brice Laffleur for discussions and helpful comments; and Virginie Magnone, Alexandra Popa, and Pascal Barbry for help and fruitful discussions. This work was developed in close collaboration with the functional genomics platform of Nice Sophia Antipolis, a partner of the National Infrastructure France Génomique, thanks to support by the Cancéropôle PACA and Commissariat aux Grands Investissements (PB: ANR-10-INBS-09-03 and ANR-10-INBS-09-02). This work was supported in part by a PhD joint scholarship from Centre National de la Recherche Scientifique and Région Limousin (to M.M.); a PhD scholarship from the Région Limousin (to A.G., P.R., and A.-G.B.); a PhD scholarship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to A.S.); Grant DOC20150602943 from Fondation ARC (to A.S.); post doc Fellowship Grant ANR-11-BSV302701 (to S.L.N.); and grants from ARC (#SL220100601332), Conseil Régional du Limousin, Ligue Contre le Cancer, Comités de la Région Limousin, ANR-11-BSV30270, and Comité d'Orientations Recherche Cancer en Limousin.

- Perlot T, Alt FW (2008) Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv Immunol* 99:1–32.
- Sleckman BP, Oltz EM (2012) Preparing targets for V(D)J recombinase: Transcription paves the way. *J Immunol* 188(1):7–9.
- Péron S, et al. (2012) AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336(6083):931–934.
- Jhunjunwala S, et al. (2008) The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: Implications for long-range genomic interactions. *Cell* 133(2):265–279.
- Guo C, et al. (2011) CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477(7365):424–430.
- Choi NM, Feeney AJ (2014) CTCF and ncRNA regulate the three-dimensional structure of antigen receptor loci to facilitate V(D)J recombination. *Front Immunol* 5:49.
- Afshar R, Pierce S, Bolland DJ, Corcoran A, Oltz EM (2006) Regulation of IgH gene assembly: Role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol* 176(4):2439–2447.
- Bolland DJ, et al. (2007) Antisense intergenic transcription precedes IgH D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol Cell Biol* 27(15):5523–5533.
- Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E (2005) Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(40):14362–14367.
- Sakai E, Bottaro A, Davidson L, Sleckman BP, Alt FW (1999) Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(4):1526–1531.
- Featherstone K, Wood AL, Bowen AJ, Corcoran AE (2010) The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J Biol Chem* 285(13):9327–9338.
- Giallourakis CC, et al. (2010) Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(51):22207–22212.
- Lin SG, Guo C, Su A, Zhang Y, Alt FW (2015) CTCF-binding elements 1 and 2 in the IgH intergenic control region cooperatively regulate V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(6):1815–1820.
- Nicolás L, Chaudhuri J (2013) 4C-ing the IgH Landscape. *Immunity* 39(2):199–201.
- Garrett FE, et al. (2005) Chromatin architecture near a potential 3' end of the IgH locus involves modular regulation of histone modifications during B-cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25(4):1511–1525.
- Volpi SA, et al. (2012) Germ-line deletion of IgH 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5–7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the IgH locus. *J Immunol* 188(6):2556–2566.
- Li F, Eckhardt LA (2009) A role for the IgH intronic enhancer E mu in enforcing allelic exclusion. *J Exp Med* 206(1):153–167.
- Marquet M, et al. (2014) The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J Immunol* 193(3):1171–1183.
- Rouaud P, et al. (2012) Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem* 287(11):8356–8360.
- Medvedovic J, et al. (2013) Flexible long-range loops in the VH gene region of the IgH locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* 39(2):229–244.
- Pinaud E, et al. (2011) The IgH locus 3' regulatory region: Pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 110:27–70.
- Dunnick WA, et al. (2009) Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J Exp Med* 206(12):2613–2623.
- Dunnick WA, Shi J, Zerbatto JM, Fontaine CA, Collins JT (2011) Enhancement of antibody class-switch recombination by the cumulative activity of four separate elements. *J Immunol* 187(9):4733–4743.
- Dunnick WA, Shi J, Fontaine C, Collins JT (2013) Transgenes of the mouse immunoglobulin heavy chain locus, lacking distal elements in the 3' regulatory region, are impaired for class switch recombination. *PLoS One* 8(2):e55842.
- Yan Y, et al. (2011) Homologous elements hs3a and hs3b in the 3' regulatory region of the murine immunoglobulin heavy chain (IgH) locus are both dispensable for class-switch recombination. *J Biol Chem* 286(31):27123–27131.
- Manis JP, et al. (1998) Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* 188(8):1421–1431.
- Vincent-Fabert C, et al. (2009) Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol* 182(11):6926–6932.
- Bébin A-G, et al. (2010) In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J Immunol* 184(7):3710–3717.
- Pinaud E, et al. (2001) Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15(2):187–199.
- Saintamand A, et al. (2015) The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 6(7):4845–4852.
- Rouaud P, et al. (2013) The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med* 210(8):1501–1507.
- Vincent-Fabert C, et al. (2010) Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116(11):1895–1898.
- Chauveau C, Cogné M (1996) Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* 14(1):15–16.
- Saleque S, et al. (1997) Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol* 158(10):4780–4787.
- Sepulveda MA, Garrett FE, Price-Whelan A, Birshtein BK (2005) Comparative analysis of human and mouse 3' IgH regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol Immunol* 42(5):605–615.
- D'Addabbo P, Scascitelli M, Giambra V, Rocchi M, Frezza D (2011) Position and sequence conservation in amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindromic of IgH 3' regulatory region. *BMC Evol Biol* 11:71.
- Kaminski DA, Stavnezer J (2007) Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol* 19(4):545–556.
- Pefanis E, et al. (2015) RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* 161(4):774–789.
- Birshtein BK (2014) Epigenetic regulation of individual modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' regulatory region. *Front Immunol* 5:163.
- Morvan CL, Pinaud E, Decourt C, Cuvillier A, Cogné M (2003) The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102(4):1421–1427.
- Degner SC, et al. (2011) CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the IgH locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(23):9566–9571.
- Degner SC, Wong TP, Jankevicius G, Feeney AJ (2009) Cutting edge: Developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J Immunol* 182(1):44–48.
- Maul RW, et al. (2014) Spt5 accumulation at variable genes distinguishes somatic hypermutation in germinal center B cells from ex vivo-activated cells. *J Exp Med* 211(11):2297–2306.
- Lam KP, Kühn R, Rajewsky K (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90(6):1073–1083.
- Saintamand A, et al. (2015) Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germ-line deletion. *Nat Commun* 6:7084.
- Park S-R, et al. (2009) HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol* 10(5):540–550.
- Park S-R, Seo G-Y, Choi A-J, Stavnezer J, Kim P-H (2005) Analysis of transforming growth factor-beta1-induced Ig germ-line gamma2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *Eur J Immunol* 35(3):946–956.
- Sellers M, Reina-San-Martin B, Kastner P, Chan S (2009) Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206(5):1073–1087.
- Kent WJ, et al. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12(6):996–1006.

Supporting Information

Garot et al. 10.1073/pnas.1514090113

SI Materials and Methods

Mouse Models. Heterozygous mice ($3'PAL^{\Delta a/wtb}$, $3'RR^{\Delta a/wtb}$ and $hs3b-4^{\Delta a/wtb}$) were generated by crossing homozygous mice with C57BL/6 mice. Mixed Sv/129 x C57BL/6 mice were used as controls. Mice were bred and housed in specific pathogen-free conditions at 21–23 °C with a 12-h light/dark cycle. All experiments were performed according to the guidelines of the Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale du Limousin and were approved as part of the protocol registered under no. CREAAL 7-07-2012.

Southern Blots. Genomic Southern blots were performed as follows: 20 µg genomic DNA was digested by *XhoI* or *SacI*. DNA was transferred to nylon membranes (MP Biomedicals) by capillarity. Blots were hybridized with [32 P]-labeled probes generated by random priming. “X” probe located upstream from the 5' homology arm was a 0.8-kbp *HindIII-EcoRI* fragment; “Y” probe located downstream from the 3' homology arm was a 0.6-kbp *XhoI-HindIII* fragment, as indicated in Fig. S1.

Flow Cytometry. For bone marrow, cells were labeled with B220-BV510, CD117-PE, CD43-PE-Cy7, IgM-FITC, CD19-APC-H7 and CD93-APC (clone AA4.1, eBioscience), IgM^a-FITC (clone DS-1, BD Pharmingen), IgM^b-PE (clone AF6-78, BD Pharmingen). Splenocytes were stained with B220-BV510, CD21-BV605, CD23-PE-Cy7, CD19-APC-H7, CD93-APC, IgD-FITC. For the peritoneal cavity, Abs used were B220-BV510, CD5-BV605, IgM^a-FITC, IgM^b-PE. For Peyer's patches, cells were labeled with B220-BV510 or B220-V450, IgA-FITC, IgM-PE, peanut agglutinin (PNA)-FITC, FAS-PE (SouthernBiotech, BD Biosciences). Flow cytometry analysis was performed on a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences). FACS data were analyzed by FACSDIVA software (BD Biosciences). For intracellular staining, cells were first stained for surface markers. After washing, cells were treated with a Cytofix/Cytoperm kit and intracellular staining was performed with IgM^a-FITC, IgM^b-PE Abs.

For plasma cell analysis, single cells from spleens were washed with 2% (vol/vol) FCS-PBS. Cell surface staining was performed with the following Abs: B220-BV510, CD138-allophycocyanin. For intracellular staining, 5×10^6 cells were first stained for surface proteins. Then, cells were treated with a Cytofix/Cytoperm kit

(BD Biosciences) and intracellular staining was performed with IgMa-FITC, IgMb-PE Abs.

RNA-Seq Analysis. Total RNA was extracted using miRNeasy kit (Qiagen) from either freshly purified splenic B cells, obtained after gradient separation using Lympholyte Mammal (Cedarlane) followed by CD43⁺ selection (Miltenyi Biotec), or from purified splenic B cells stimulated in vitro (10^6 cells/mL) for 48 h in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS (Lonza) and with 5 µg/mL LPS (Cayla Invivogen), separated on a lympholyte mammal gradient. For each genotype (*wt*, $3'PAL^{\Delta/\Delta}$, $hs3b-4^{\Delta/\Delta}$, $3'RR^{\Delta/\Delta}$), RNA sample was prepared from a pool of equivalent numbers of purified B cells from four animals. For RNA-seq library, 1 µg of total RNA was depleted from ribosomal RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina), ligated, reverse-transcribed, and amplified (14 cycles) with the reagents from the TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina). Libraries were quantified with the Bioanalyzer DNA 1000 Kit (Agilent). Four nanomolars of libraries were then diluted and denatured according to the Illumina recommendations. Paired-end 150-bp reads were sequenced on an Illumina NextSeq 500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina). Illumina NextSeq 500 paired-end 2×150 -nt reads were mapped with STAR release v2.4.0a versus mm10 with gene model from ensembl release 77, with default parameters. Quantification of genes was then performed using featureCounts release subread-1.4.6-p1-Linux-x86_64 with “-primary -g gene_name -p -s 1 -M” options based on Ensembl GTF release 77 annotations.

Secreted Ig in Plasma and Supernatants. Supernatants from in vitro-stimulated B cells, harvested after 4-d culture, and sera from *wt* or homozygous mutant mice were tested for the presence and concentration of different Ig isotypes by ELISA, as previously described (29).

Specific Ig Isotype Response upon Ag Stimulation. Animal cohorts, including *wt*^a/*wt*^b and $3'PAL^{\Delta a/wtb}$, were analyzed for the presence of ovalbumin-specific Ig isotypes in sera by ELISA. Allo-type-specific IgM, IgG1, and IgG2a responses to OVA were determined as previously described (28).

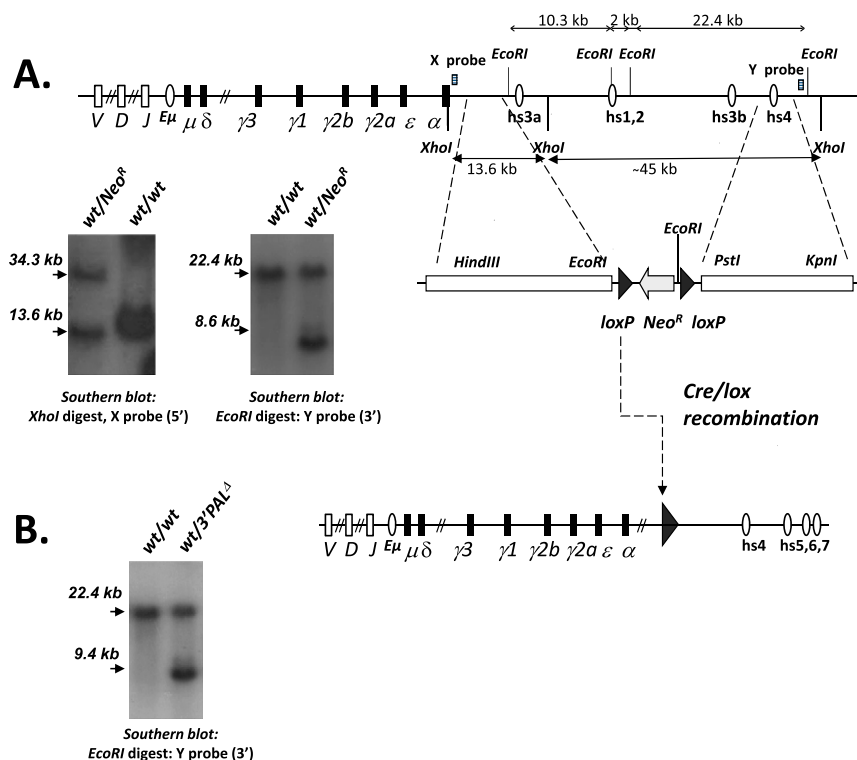


Fig. S1. Targeting the *IgH* 3'RR proximal (quasi-palindromic) module in the mouse. (A) ES cell targeting strategy used to generate the 3'PAL KO mouse model in which the *hs3a* to *hs3b* region (so called 3'RR proximal module) was disrupted by insertion of a *loxP* site. Map of the mouse *wt IgH* 3'RR. Closed circles stand for transcriptional enhancers. Targeting construct and Southern blots of knockout ES cells or animals carrying *Neo^r* insertion. The 5' probe (X, 0.8-kb *EcoRI*-*HindIII* fragment) detects genomic 13.6-kb and 34.3-kb *XhoI* bands after homozygous recombination. The 3' probe (Y, 0.6-kb *XhoI*-*HindIII* fragment) detects genomic 22.4-kb and 8.6-kb *EcoRI* bands in the targeted locus. (B) Map of the *cre*-deleted targeted locus. Southern blot on mouse tail DNA with 3' Y probe detects genomic 22.4-kb and 9.4-kb *EcoRI* bands in the targeted locus.

Bone marrow: gated CD19⁺

Spleen: gated CD19⁺

Peritoneal cavity: gated B220⁺

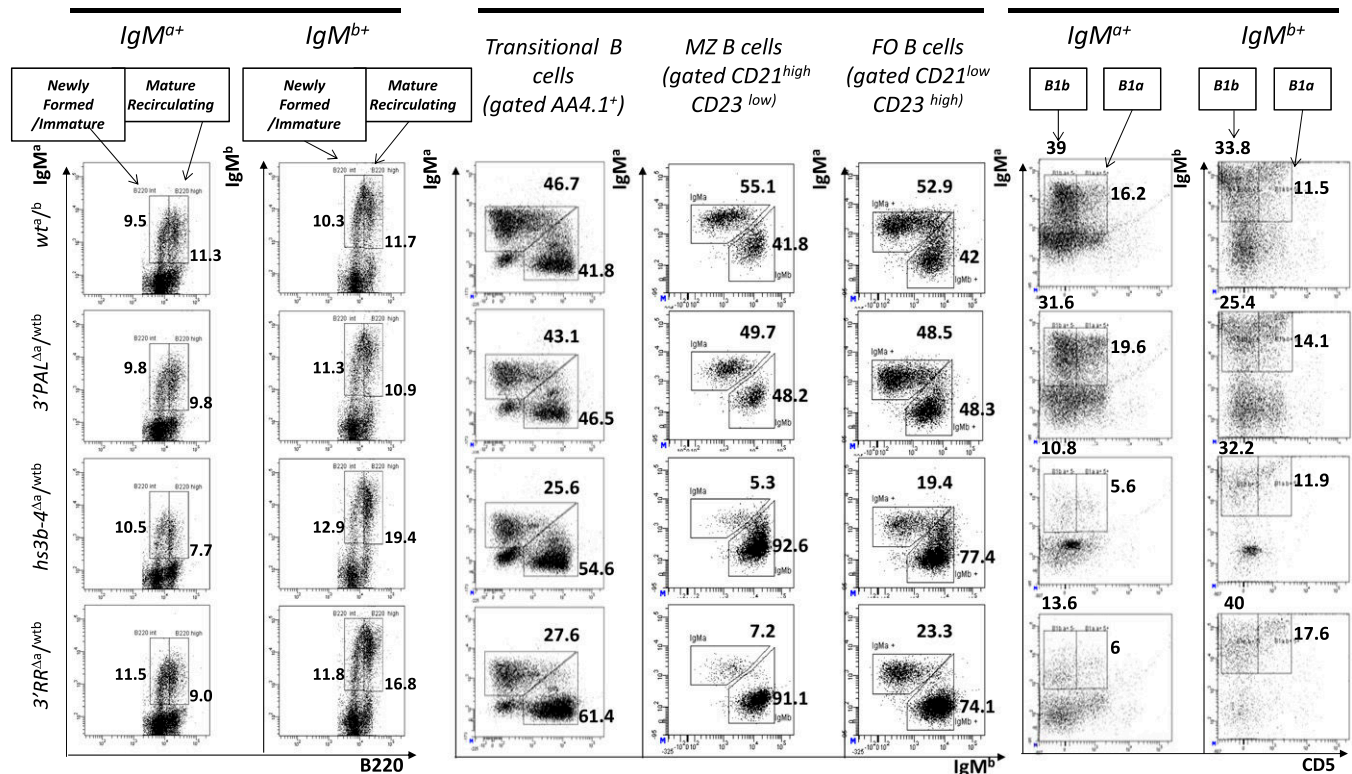
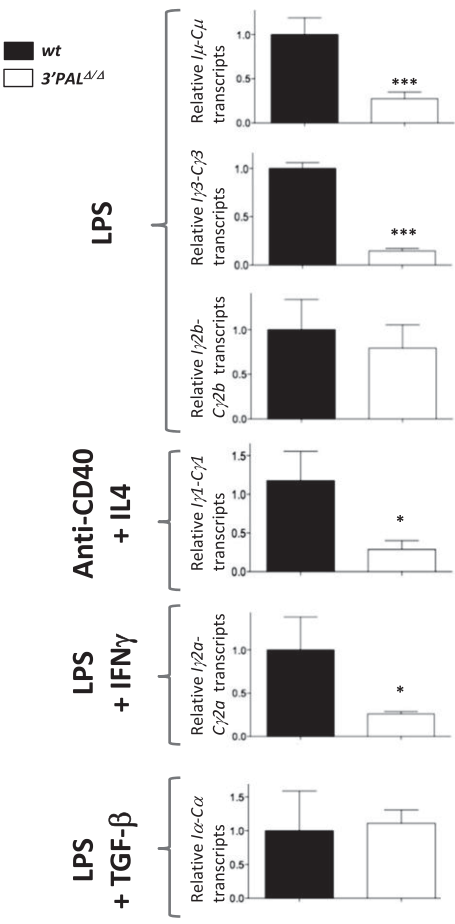
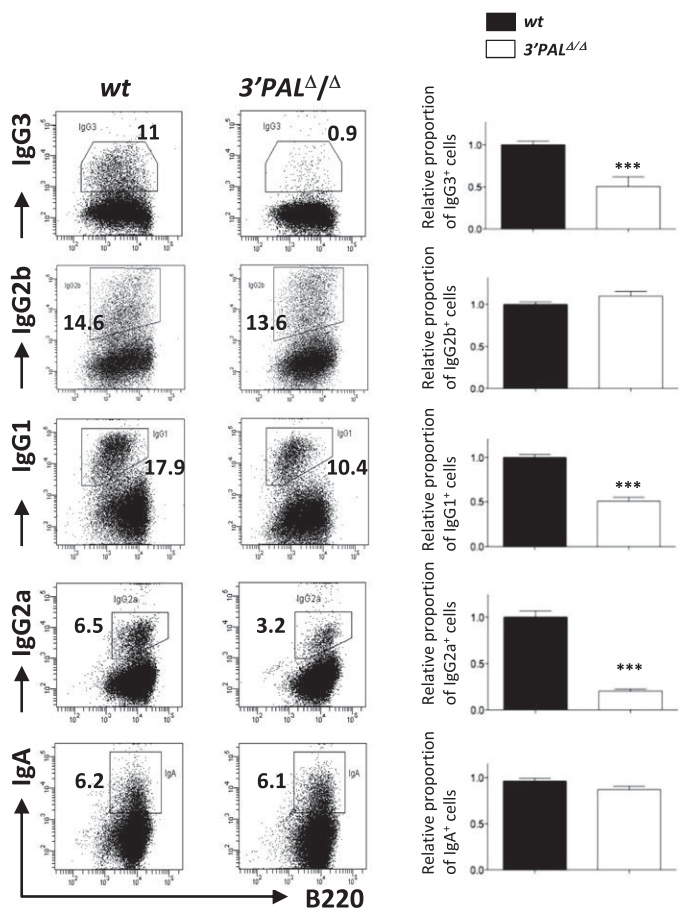


Fig. S2. B-cell subsets analysis by flow cytometry in a/b heterozygous mutant models. Freshly collected cells from 8- to 10-wk-old F1 mice (expressing IgH alleles of a and b allotypes) of each genotype (*wt^{a/b}*, *3'PAL^{Δa}/wtb*, *hs3b-4^{Δa}/wtb*, and *3'RR^{Δa}/wtb*) were stained with fluorescent antibodies and analyzed by FACS. For Bone marrow B220⁺-gated cells, IgM^{a+}- and IgM^{b+}-expressing cells were separated: percentages of B220^{int}/IgM⁺ NF/immature B cells and B220^{high}/IgM⁺ mature recirculating (MR) B cells are indicated. Splenic populations: dot plots show percentage of AA4.1⁺-gated transitional B cells expressing intracellular IgM^a or IgM^b allotypes; percentage of cells expressing intracellular IgM^a or IgM^b allotypes in MZ B cells (gated on CD19⁺ B220⁺ CD21^{high} CD23^{low}) and FO B cells (gated on CD19⁺ B220⁺ CD21^{low} CD23^{high}). For B220⁺-gated peritoneal cavity B-lineage cells, IgM^{a+}- and IgM^{b+}-expressing cells were separated: percentage of CD5⁻/IgM⁺ B1b B cells and CD5⁺/IgM⁺ B1a B cells are indicated.

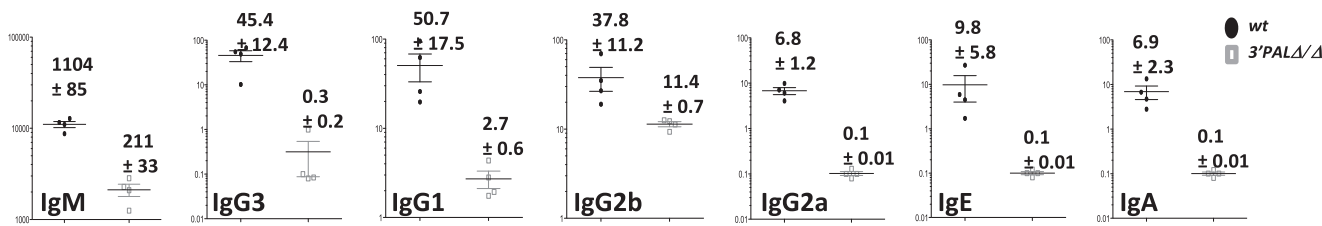
A. Pre-CSR germline transcripts



B. Surface expression of class switched isotypes



C. Ig secretion in supernatants (ng/mL)



D. IncRNA-CSR expression

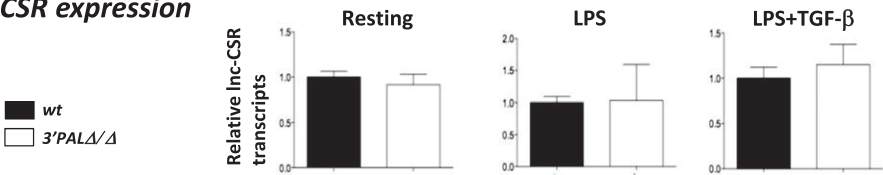
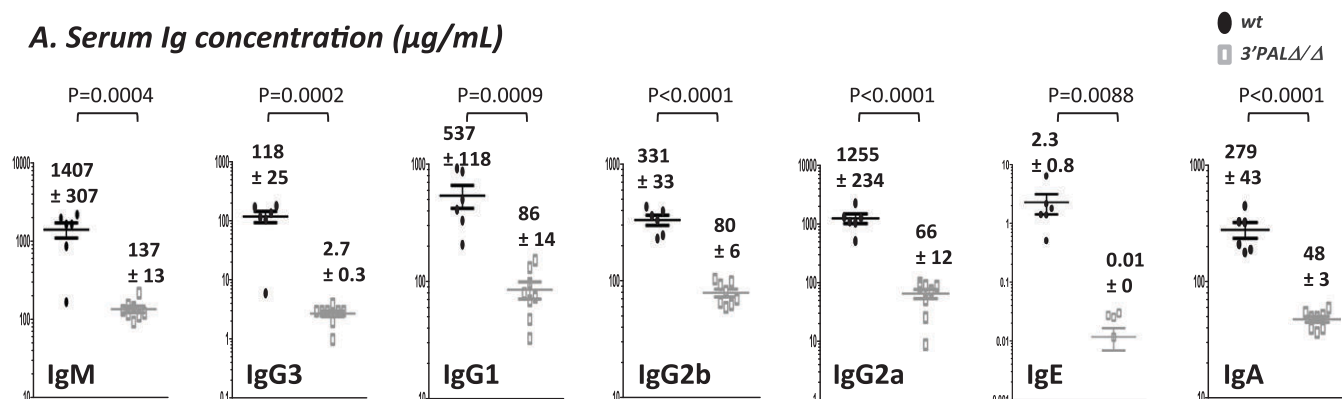


Fig. S4. Impaired CSR in in vitro-stimulated B cells lacking the *IgH* 3'RR proximal module. Resting splenic B cells (CD43⁺ fraction) from wt and 3'PAL Δ/Δ mice were stimulated in vitro to induce CSR with LPS (IgG2b and IgG3), LPS + TGF- β (for IgA), LPS + IFN- γ (for IgG2a) or anti-CD40 + IL-4 (for IgG1 and IgE). (A) For each constant gene, germ-line transcription (*I* α -C α) was quantified by qRT-PCR and normalized to *Gapdh* expression after 48–72 h stimulation. Mean and SEM are reported, significant differences were indicated by *P* values: **P* < 0.05, ****P* < 0.001 according to the Mann–Whitney *u* test (*n* = 4–11 animals per genotype). (B) At day 4, percentage of isotype switched cells was analyzed by flow cytometry for surface Ig isotype expression: Center shows one representative experiment, Right displays statistical analysis of the proportion in vitro-induced isotype switched B cells for each condition. Mean and SEM are reported, significant differences are indicated by *P* values: **P* < 0.05, ****P* < 0.001 according to the Mann–Whitney *u* test (*n* = 12–28 animals per genotype). (C) Antibody isotype secretion was quantified by ELISA in stimulated B-cell supernatants at day 4. (D) Transcription of IncRNA for CSR was quantified by qRT-PCR (38) and normalized to *Gapdh* expression in wt and 3'PAL Δ/Δ resting splenic and activated B cells for 48 (LPS) to 72 h (LPS+TGF- β). Mean and SEM are indicated (*n* = 6 animals).

A. Serum Ig concentration ($\mu\text{g/mL}$)



B. OVA-specific response

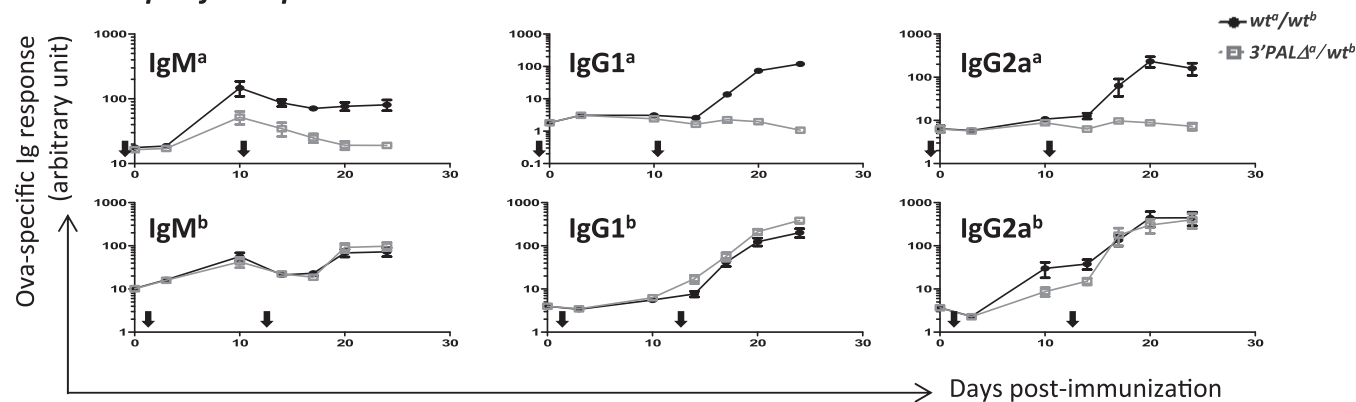


Fig. 55. The 3'*RR* quasi-palindrome controls serum antibody production and antigen-specific immune response. (A) Serum Ig isotype levels quantified by ELISA in 8-wk-old wt and 3'PAL Δ/Δ mice. Mean \pm SEM are shown and significant differences indicated with a *P* value, according to the Student *t* test. (B) ELISA quantification of ovalbumin-specific Ig isotype in serum from immunized 8-wk-old wt^{a/b} and 3'PAL Δ ^{a/wt^b} mice. Ab levels are indicated on the y axis in arbitrary units by comparison with a control serum. Days postimmunization are indicated on the x axis; arrows indicate first and second antigen injections. Each point is the mean of serum quantification for five animals. (Upper) "a" allotype responses for IgM, IgG1 and IgG2a isotypes; (Lower) "b" allotype responses for the same Ig classes. One significant experiment is shown.

Table S1. Absolute numbers of leukocytes and B-lineage cells in bone marrow, spleen and Peyer's patches of 8- to 12-wk-old mice carrying IgH alleles of different haplotypes: wt^a/wt^b (129-C57BL/6 F1 mice), $3'PAL^{a/a}/wt^b$, $hs3b-4^{a/a}/wt^b$, and $3'RR^{a/a}/wt^b$

Location	wt^a/wt^b	IgM^b/IgM^b ratio	$3'PAL^{a/a}/wt^b$	IgM^a/IgM^b ratio	$hs3b-4^{a/a}/wt^b$	IgM^a/IgM^b ratio	$3'RR^{a/a}/wt^b$	IgM^a/IgM^b ratio
Bone marrow								
Leukocytes	83.7 ± 2.5 $n = 11$	—	79.8 ± 9.7 $n = 9$	—	66.4 ± 6.4 $n = 4$	—	71.1 ± 3.0 $n = 11$	—
Total B cells (B220 ⁺)	25.7 ± 1.7 $n = 11$	—	24.2 ± 3.7 $n = 9$	—	17.8 ± 1.8 $n = 4$	—	22.3 ± 0.9 $n = 11$	—
IgM ^a immature B cells (B220 ^{int} IgM ^{a++})	8.8 ± 0.2 $n = 7$	0.93	6.2 ± 0.7 $n = 5$	0.95	7.6 ± 0.4 $n = 4$	0.93	9.1 ± 0.5 $n = 11$	0.96
IgM ^b immature B cells (B220 ^{int} IgM ^{b++})	9.5 ± 0.3 $n = 7$	—	6.5 ± 0.8 $n = 5$	—	8.2 ± 0.8 $n = 4$	—	9.5 ± 0.6 $n = 11$	—
IgM ^a mature B cells (B220 ^{high} IgM ^{a++})	8.3 ± 0.4 $n = 7$	0.94	8.1 ± 0.5 $n = 5$	0.93	4.6 ± 0.6 $n = 4$	0.43	7.9 ± 0.5 $n = 11$	0.57
IgM ^b mature B cells (B220 ^{high} IgM ^{b++})	8.8 ± 0.4 $n = 7$	—	8.7 ± 0.5 $n = 5$	—	10.6 ± 1.8 $n = 4$	—	13.9 ± 0.9 $n = 11$	—
Spleen								
Leukocytes	149.2 ± 13.6 $n = 19$	—	172.3 ± 10.4 $n = 14$	—	179.7 ± 12.6 $n = 9$	—	156.6 ± 6.6 $n = 16$	—
Total B cells (B220 ⁺ CD19 ⁺)	44.9 ± 4.7 $n = 11$	—	51.3 ± 3.3 $n = 9$	—	50.7 ± 5.2 $n = 4$	—	54.8 ± 2.4 $n = 11$	—
IgM ^a follicular B cells (CD23 ^{high})	18.0 ± 2.3 $n = 7$	1.09	16.1 ± 0.8 $n = 5$	0.89	6.1 ± 0.8 $n = 4$	0.21	8.5 ± 0.6 $n = 7$	0.25
CD21 ^{low} IgM ^{a++}	—	—	—	—	—	—	—	—
IgM ^b follicular B cells (CD23 ^{high})	16.5 ± 2.2 $n = 7$	—	18.1 ± 1.0 $n = 5$	—	29.1 ± 2.2 $n = 4$	—	34.1 ± 2.0 $n = 7$	—
CD21 ^{low} IgM ^{b++}	—	—	—	—	—	—	—	—
IgM ^a marginal zone B cells (CD23 ^{low})	2.2 ± 0.2 $n = 7$	1.16	1.6 ± 0.2 $n = 5$	0.94	0.3 ± 0.04 $n = 4$	0.05	0.3 ± 0.03 $n = 7$	0.06
CD21 ^{high} IgM ^{a++}	—	—	—	—	—	—	—	—
IgM ^b marginal zone B cells (CD23 ^{low})	1.9 ± 0.1 $n = 7$	—	1.7 ± 0.2 $n = 5$	—	5.7 ± 0.4 $n = 4$	—	4.6 ± 0.3 $n = 7$	—
CD21 ^{high} IgM ^{b++}	—	—	—	—	—	—	—	—
IgM ^a transitional B cells (AA4.1 ⁺ IgM ^{a++})	8.0 ± 0.6 $n = 7$	1.13	5.2 ± 0.8 $n = 5$	0.93	4.2 ± 0.5 $n = 4$	0.44	3.4 ± 0.5 $n = 7$	0.44
IgM ^b transitional B cells (AA4.1 ⁺ IgM ^{b++})	7.1 ± 0.6 $n = 7$	—	5.6 ± 0.8 $n = 5$	—	9.5 ± 1.0 $n = 4$	—	7.7 ± 1.1 $n = 7$	—
Peyer's patches								
Leukocytes	15.0 ± 1.3 $n = 11$	—	20.6 ± 3.7 $n = 9$	—	14.2 ± 3.3 $n = 4$	—	11.0 ± 2.4 $n = 7$	—
Total B cells (B220 ⁺)	9.8 ± 0.9 $n = 11$	—	14.6 ± 2.8 $n = 9$	—	10.9 ± 2.4 $n = 4$	—	8.3 ± 1.9 $n = 7$	—
IgM ^a B cells	3.9 ± 0.3 $n = 11$	1.11	5.2 ± 0.7 $n = 9$	1.21	2.2 ± 0.5 $n = 4$	0.30	2.0 ± 0.5 $n = 7$	0.37
IgM ^b B cells	3.5 ± 0.3 $n = 11$	—	4.3 ± 0.6 $n = 9$	—	7.2 ± 1.6 $n = 4$	—	5.4 ± 1.3 $n = 7$	—

Means ± SEM are reported; number of animals is reported; within a given B-cell subset expressing a- or b- allele, the a/b ratio is reported.

Table S2. Absolute numbers of leukocytes and B-lineage cells in bone marrow, spleen, peritoneal cavity, and Peyer's patches of 8-wk-old *wt* and *3'PAL*^{Δ/Δ} mice

Means \pm SEM are reported; number of animals is reported; significance (*P* value) between the two genotypes is assessed by a Student *t* test.

Bibliographie

- Abdouni, H., King, J.J., Suliman, M., Quinlan, M., Fifield, H., and Larijani, M. (2013). Zebrafish AID is capable of deaminating methylated deoxycytidines. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5457–5468.
- Adams, J.M., Gerondakis, S., Webb, E., Corcoran, L.M., and Cory, S. (1983). Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 1982–1986.
- Adelman, K., Marr, M.T., Werner, J., Saunders, A., Ni, Z., Andrulis, E.D., and Lis, J.T. (2005). Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Mol. Cell* *17*, 103–112.
- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., and Oltz, E.M. (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 2439–2447.
- Aguilera, A., and García-Muse, T. (2012). R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell* *46*, 115–124.
- Alessandrini, A., and Desiderio, S.V. (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 2096–2107.
- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 149–157.
- Allman, D., Srivastava, B., and Lindsley, R.C. (2004). Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* *197*, 147–160.
- Alt, F.W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 4118–4122.

- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* 152, 417–429.
- Amé-Thomas, P., and Tarte, K. (2014). The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 24, 23–32.
- Amin, R., Marfak, A., Pangault, C., Oblet, C., Chanut, A., Tarte, K., Denizot, Y., and Cogné, M. (2014). The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget* 5, 8995–9006.
- Andersson, T., Furebring, C., Borrebaeck, C.A., and Pettersson, S. (1999). Temporal expression of a V(H) promoter-Cmu transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol. Immunol.* 36, 19–29.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D’Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* 205, 1357–1368.
- Arakawa, H., Shimizu, T., and Takeda, S. (1996). Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. *Int. Immunol.* 8, 91–99.
- Aranburu, A., Ceccarelli, S., Giorda, E., Lasorella, R., Ballatore, G., and Carsetti, R. (2010). TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 7293–7301.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Brière, F., Banchereau, J., Lebecque, S., and Liu, Y.J. (1997). Human peripheral B cell development. sIgM-IgD+CD38+ hypermutated germinal center centroblasts preferentially express Ig lambda light chain and have undergone mu-to-delta switch. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 815, 193–198.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Brière, F., Banchereau, J., Lebecque, S., and Liu, Y.J. (1998). The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal

center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J. Exp. Med.* 187, 1169–1178.

Arulampalam, V., Grant, P.A., Samuelsson, A., Lendahl, U., and Pettersson, S. (1994). Lipopolysaccharide-dependent transactivation of the temporally regulated immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Eur. J. Immunol.* 24, 1671–1677.

Askary, A., Shimazaki, N., Bayat, N., and Lieber, M.R. (2014). Modeling of the RAG reaction mechanism. *Cell Rep.* 7, 307–315.

Atchison, M.L. (2014). Function of YY1 in Long-Distance DNA Interactions. *Front. Immunol.* 5, 45.

Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., et al. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 366–374.

Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341–352.

Banerji, J., Olson, L., and Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33, 729–740.

Barber, C.L., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2011). Reduced production of B-1-specified common lymphoid progenitors results in diminished potential of adult marrow to generate B-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13700–13704.

Bardwell, P.D., Woo, C.J., Wei, K., Li, Z., Martin, A., Sack, S.Z., Parris, T., Edelmann, W., and Scharff, M.D. (2004). Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat. Immunol.* 5, 224–229.

Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2004). H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 149–153.

Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* *438*, 508–511.

Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Cheng, H.-L., Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2009). Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 561–568.

Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wesemann, D.R., Januszyk, K., et al. (2011). The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. *Cell* *144*, 353–363.

Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 15–27.

Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 34–46.

Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogné, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3710–3717.

Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., and Honjo, T. (2012). The histone chaperone Spt6 is required for activation-induced cytidine deaminase target determination through H3K4me3 regulation. *J. Biol. Chem.* *287*, 32415–32429.

Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* *146*, 866–872.

Bhutani, N., Decker, M.N., Brady, J.J., Bussat, R.T., Burns, D.M., Corbel, S.Y., and Blau, H.M. (2013). A critical role for AID in the initiation of reprogramming to induced pluripotent stem cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 1107–1113.

Birshtein, B.K. (2012). The role of CTCF binding sites in the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Front. Genet.* *3*, 251.

Birshstein, B.K. (2014). Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' Regulatory Region. *Front. Immunol.* 5, 163.

Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C.T., Wang, J.H., Wesemann, D.R., Zhang, T., Fazeli, A., Feldman, L., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., et al. (2010a). Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3034–3039.

Boboila, C., Yan, C., Wesemann, D.R., Jankovic, M., Wang, J.H., Manis, J., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., and Alt, F.W. (2010b). Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J. Exp. Med.* 207, 417–427.

Boboila, C., Alt, F.W., and Schwer, B. (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* 116, 1–49.

Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., and Chen, J. (2000). Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1184–1189.

Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., and Corcoran, A.E. (2007). Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5523–5533.

Bombardieri, M., Kam, N.-W., Brentano, F., Choi, K., Filer, A., Kyburz, D., McInnes, I.B., Gay, S., Buckley, C., and Pitzalis, C. (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1857–1865.

Bose, P., Dai, Y., and Grant, S. (2014). Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacol. Ther.* 143, 323–336.

Bosma, G.C., Kim, J., Urich, T., Fath, D.M., Cotticelli, M.G., Ruetsch, N.R., Radic, M.Z., and Bosma, M.J. (2002). DNA-dependent protein kinase activity is not required for immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* 196, 1483–1495.

- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., Bunting, S.F., Klein, I.A., Feldhahn, N., Barlow, J., Chen, H.-T., Bosque, D., Callen, E., et al. (2011). Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol. Cell* 42, 319–329.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F., and Alt, F.W. (1998). Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int. Immunol.* 10, 799–806.
- Bouamar, H., Jiang, D., Wang, L., Lin, A.-P., Ortega, M., and Aguiar, R.C.T. (2015). MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1329–1340.
- Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* 15, 5093–5103.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1–14.
- Brandt, V.L., and Roth, D.B. (2009). Recent insights into the formation of RAG-induced chromosomal translocations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 650, 32–45.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4102–4107.
- Brink, R., Fulcher, D.A., Goodnow, C.C., and Basten, A. (1994). Differential regulation of early and late stages of B lymphocyte development by the mu and delta membrane heavy chains of Ig. *Int. Immunol.* 6, 1905–1916.
- Brioli, A., Melchor, L., Cavo, M., and Morgan, G.J. (2014). The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 165, 441–454.
- Brookes, E., de Santiago, I., Hebenstreit, D., Morris, K.J., Carroll, T., Xie, S.Q., Stock, J.K., Heidemann, M., Eick, D., Nozaki, N., et al. (2012). Polycomb associates genome-wide with a

specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 157–170.

Buchanan, K.L., Hodgetts, S.I., Byrnes, J., and Webb, C.F. (1995). Differential transcription efficiency of two Ig VH promoters in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* 155, 4270–4277.

Buchanan, K.L., Smith, E.A., Dou, S., Corcoran, L.M., and Webb, C.F. (1997). Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J. Immunol. Baltim. Md* 159, 1247–1254.

Bulger, M., and Groudine, M. (2010). Enhancers: The abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Dev. Biol.* 339, 250–257.

Calin, G.A., and Croce, C.M. (2007). Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J. Clin. Invest.* 117, 2059–2066.

Campbell, P.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., O’Meara, S., Li, H., Santarius, T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Hardy, C., et al. (2008). Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat. Genet.* 40, 722–729.

Campos-Sanchez, E., Toboso-Navasa, A., Romero-Camarero, I., Barajas-Diego, M., Sanchez-García, I., and Cobaleda, C. (2011). Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: a crucial interrelationship. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 3473–3486.

Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., and Stuart, J.M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113–1120.

Cancro, M.P. (2004). Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunol. Rev.* 197, 89–101.

Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., et al. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md* 180, 800–808.

- Carsetti, R., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1993). A role for immunoglobulin D: interference with tolerance induction. *Eur. J. Immunol.* 23, 168–178.
- Carsetti, R., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* 181, 2129–2140.
- Carson, S., and Wu, G.E. (1989). A linkage map of the mouse immunoglobulin lambda light chain locus. *Immunogenetics* 29, 173–179.
- Casellas, R., Resch, W., Hakim, O., and Nussenzweig, M.C. (2013). The origin of B cell recurrent chromosomal translocations: proximity versus DNA damage. *Mol. Cell* 51, 275–276.
- Castellano-Pozo, M., Santos-Pereira, J.M., Rondón, A.G., Barroso, S., Andújar, E., Pérez-Alegre, M., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2013). R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation. *Mol. Cell* 52, 583–590.
- Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967–3975.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132.
- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., and Sen, R. (2007). Repeat organization and epigenetic regulation of the DH-Cmu domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol. Cell* 27, 842–850.
- Chandra, V., Bortnick, A., and Murre, C. (2015). AID targeting: old mysteries and new challenges. *Trends Immunol.* 36, 527–535.
- Chaturvedi, A., Siddiqui, Z., Bayiroglu, F., and Rao, K.V.S. (2002). A GPI-linked isoform of the IgD receptor regulates resting B cell activation. *Nat. Immunol.* 3, 951–957.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 541–552.

- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730.
- Chaudhuri, J., Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430, 992–998.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* 94, 157–214.
- Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16.
- Chauveau, C., Decourt, C., and Cogné, M. (1998a). Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene* 222, 279–285.
- Chauveau, C., Pinaud, E., and Cogne, M. (1998b). Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28, 3048–3056.
- Chauveau, C., Jansson, E.A., Müller, S., Cogné, M., and Pettersson, S. (1999). Cutting edge: Ig heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position-independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 4637–4641.
- Chen, C., and Birshstein, B.K. (1996). A region of the 20 bp repeats lies 3' of human Ig Calpha1 and Calpha2 genes. *Int. Immunol.* 8, 115–122.
- Chen, C., and Birshstein, B.K. (1997). Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 1310–1318.
- Chen, K., and Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 345–352.

- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., and Alt, F.W. (1993). Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* *12*, 4635–4645.
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengtén, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* *10*, 889–898.
- Chen, Z., Viboolsittiseri, S.S., O'Connor, B.P., and Wang, J.H. (2012). Target DNA sequence directly regulates the frequency of activation-induced deaminase-dependent mutations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3970–3982.
- Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R.L., Lewis, S.M., Molinie, B., Ho, Y.-J., Myers, D.R., Choi, V.W., Compagno, M., Malkin, D.J., et al. (2011). Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* *147*, 107–119.
- Choi, N.M., and Feeney, A.J. (2014). CTCF and ncRNA Regulate the Three-Dimensional Structure of Antigen Receptor Loci to Facilitate V(D)J Recombination. *Front. Immunol.* *5*, 49.
- Chung, J.B., Baumeister, M.A., and Monroe, J.G. (2001). Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 736–740.
- Chung, J.B., Sater, R.A., Fields, M.L., Erikson, J., and Monroe, J.G. (2002). CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int. Immunol.* *14*, 157–166.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 343–349.
- Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K., and Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 69–80.

Cockerill, P.N., Yuen, M.H., and Garrard, W.T. (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J. Biol. Chem.* 262, 5394–5397.

Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L., and Alt, F.W. (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77, 737–747.

Constantinescu, A., and Schlissel, M.S. (1997). Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J. Exp. Med.* 185, 609–620.

Conticello, S.G. (2008). The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* 9, 229.

Conticello, S.G., Thomas, C.J.F., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* 22, 367–377.

Conticello, S.G., Langlois, M.-A., Yang, Z., and Neuberger, M.S. (2007). DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. *Adv. Immunol.* 94, 37–73.

Conticello, S.G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2008). Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNBL1. *Mol. Cell* 31, 474–484.

Cook, A.J.L., Oganessian, L., Harumal, P., Basten, A., Brink, R., and Jolly, C.J. (2003). Reduced switching in SCID B cells is associated with altered somatic mutation of recombined S regions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 6556–6564.

Cortizas, E.M., Zahn, A., Hajjar, M.E., Patenaude, A.-M., Di Noia, J.M., and Verdun, R.E. (2013). Alternative end-joining and classical nonhomologous end-joining pathways repair different types of double-strand breaks during class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 5751–5763.

Cory, S., Gerondakis, S., and Adams, J.M. (1983). Interchromosomal recombination of the cellular oncogene c-myc with the immunoglobulin heavy chain locus in murine plasmacytomas is a reciprocal exchange. *EMBO J.* 2, 697–703.

Covey, L.R., Ferrier, P., and Alt, F.W. (1990). VH to VHDJH rearrangement is mediated by the internal VH heptamer. *Int. Immunol.* 2, 579–583.

Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J., and Calame, K. (1982). Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* 218, 1319–1321.

Crouch, E.E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montaña, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F.N., et al. (2007). Regulation of AID expression in the immune response. *J. Exp. Med.* 204, 1145–1156.

D’Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., and Frezza, D. (2011). Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3’Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.

Dalla-Favera, R., and Pasqualucci, L. (2015). Chapter 22 - Molecular Pathogenesis of B Cell Lymphomas. In *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, F.W.A.H.R. Reth, ed. (London: Academic Press), pp. 399–416.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7824–7827.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* 41, 599–613.

Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., and Mårtensson, I.-L. (2007). Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282.

Daniel, J.A., Santos, M.A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K.R., Jankovic, M., Filsuf, D., Chen, H.-T., Gazumyan, A., Yamane, A., et al. (2010). PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 329, 917–923.

Dariavach, P., Williams, G.T., Campbell, K., Pettersson, S., and Neuberger, M.S. (1991). The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur. J. Immunol.* 21, 1499–1504.

Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int. Immunol.* 16, 395–404.

Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., and Feeney, A.J. (2009). Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 44–48.

Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* 33, 2108–2113.

Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 311, 752–755.

De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.

Dianova, I.I., Bohr, V.A., and Dianov, G.L. (2001). Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 12639–12644.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* 197, 1291–1296.

Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.-Y., Mahowald, G., Chen, H.T., Kruhlak, M.J., Callen, E., Livak, F., Nussenzweig, M.C., et al. (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* 456, 529–533.

Dominguez, P.M., Teater, M., Chambwe, N., Kormaksson, M., Redmond, D., Ishii, J., Vuong, B., Chaudhuri, J., Melnick, A., Vasanthakumar, A., et al. (2015). DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. *Cell Rep.* 12, 2086–2098.

Dorshkind, K., and Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 213–219.

Dreyer, W.J., and Bennett, J.C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 864–869.

Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F., and Crouch, R.J. (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an Escherichia coli delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3526–3530.

Duan, H., Heckman, C.A., and Boxer, L.M. (2007). The immunoglobulin heavy-chain gene 3' enhancers deregulate bcl-2 promoter usage in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 26, 2635–2641.

Dudley, D.D., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Kaylor, L., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Internal IgH class switch region deletions are position-independent and enhanced by AID expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9984–9989.

Duke, J.L., Liu, M., Yaari, G., Khalil, A.M., Tomayko, M.M., Shlomchik, M.J., Schatz, D.G., and Kleinstein, S.H. (2013). Multiple transcription factor binding sites predict AID targeting in non-Ig genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3878–3888.

Dunnick, W.A., Shi, J., Graves, K.A., and Collins, J.T. (2005). The 3' end of the heavy chain constant region locus enhances germline transcription and switch recombination of the four gamma genes. *J. Exp. Med.* 201, 1459–1466.

Dunnick, W.A., Collins, J.T., Shi, J., Westfield, G., Fontaine, C., Hakimpour, P., and Papavasiliou, F.N. (2009). Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* 206, 2613–2623.

Duong, B.H., Ota, T., Aït-Azzouzene, D., Aoki-Ota, M., Vela, J.L., Huber, C., Walsh, K., Gavin, A.L., and Nemazee, D. (2010). Peripheral B cell tolerance and function in transgenic mice expressing an IgD superantigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4143–4158.

Duty, J.A., Szodoray, P., Zheng, N.-Y., Koelsch, K.A., Zhang, Q., Swiatkowski, M., Mathias, M., Garman, L., Helms, C., Nakken, B., et al. (2009). Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 206, 139–151.

Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981–992.

Eastman, Q.M., Leu, T.M., and Schatz, D.G. (1996). Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature* 380, 85–88.

Eaton, S., and Calame, K. (1987). Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7634–7638.

Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2011). The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175–187.

Ebert, A., Hill, L., and Busslinger, M. (2015). Spatial Regulation of V-(D)J Recombination at Antigen Receptor Loci. *Adv. Immunol.* 128, 93–121.

Eckhardt, L.A., and Birshtein, B.K. (1985). Independent immunoglobulin class-switch events occurring in a single myeloma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 5, 856–868.

Ellestad, K.K., and Magor, B.G. (2005). Evolution of transcriptional enhancers in the immunoglobulin heavy-chain gene: functional characteristics of the zebrafish E μ 3' enhancer. *Immunogenetics* 57, 129–139.

Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., et al. (2014). Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4513–4518.

Engel, H., Rolink, A., and Weiss, S. (1999). B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur. J. Immunol.* 29, 2167–2176.

Ernst, P., and Smale, S.T. (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.

Esplin, B.L., Welner, R.S., Zhang, Q., Borghesi, L.A., and Kincade, P.W. (2009). A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5773–5778.

Fear, D.J. (2013). Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 619–628.

Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and Corcoran, A.E. (2010). The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285, 9327–9338.

Fedorova, E., and Zink, D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 2174–2184.

Feldman, S., Achour, I., Wuerffel, R., Kumar, S., Gerasimova, T., Sen, R., and Kenter, A.L. (2015). Constraints contributed by chromatin looping limit recombination targeting during Ig class switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 2380–2389.

Fiancette, R., Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Laffleur, B., Magnone, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2011). A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to

lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 5772–5782.

Forsgren, A., and Grubb, A.O. (1979). Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *122*, 1468–1472.

Forsgren, A., Brant, M., Möllenkvist, A., Muyombwe, A., Janson, H., Woin, N., and Riesbeck, K. (2001). Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from *Moraxella catarrhalis*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 2112–2120.

Fraenkel, S., Mostoslavsky, R., Novobrantseva, T.I., Pelanda, R., Chaudhuri, J., Esposito, G., Jung, S., Alt, F.W., Rajewsky, K., Cedar, H., et al. (2007). Allelic “choice” governs somatic hypermutation in vivo at the immunoglobulin kappa-chain locus. *Nat. Immunol.* *8*, 715–722.

Franchini, D.-M., Schmitz, K.-M., and Petersen-Mahrt, S.K. (2012). 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 419–441.

Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., et al. (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell* *21*, 201–214.

Franco, S., Murphy, M.M., Li, G., Borjeson, T., Boboila, C., and Alt, F.W. (2008). DNA-PKcs and Artemis function in the end-joining phase of immunoglobulin heavy chain class switch recombination. *J. Exp. Med.* *205*, 557–564.

Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., and Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* *396*, 173–177.

Frieder, D., Larijani, M., Collins, C., Shulman, M., and Martin, A. (2009). The concerted action of Msh2 and UNG stimulates somatic hypermutation at A . T base pairs. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 5148–5157.

Fritz, E.L., Rosenberg, B.R., Lay, K., Mihailović, A., Tuschl, T., and Papavasiliou, F.N. (2013). A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* *14*, 749–755.

- Fujimura, S., Matsui, T., Kuwahara, K., Maeda, K., and Sakaguchi, N. (2008). Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene. *Mol. Immunol.* *45*, 1712–1719.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic Hypermutation in the Heavy Chain Locus Correlates with Transcription. *Immunity* *9*, 105–114.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* *18*, 411–422.
- Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J., et al. (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* *95*, 891–902.
- Gardner, K.E., Allis, C.D., and Strahl, B.D. (2011). Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J. Mol. Biol.* *409*, 36–46.
- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenko, V.V., and Birshstein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1511–1525.
- Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 703–713.
- Geisberger, R., Lamers, M., and Achatz, G. (2006). The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* *118*, 429–437.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7779–7786.

Genetta, T., Ruezinsky, D., and Kadesch, T. (1994). Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6153–6163.

van Gent, D.C., McBlane, J.F., Ramsden, D.A., Sadofsky, M.J., Hesse, J.E., and Gellert, M. (1995). Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* *81*, 925–934.

Gerasimova, T., Guo, C., Ghosh, A., Qiu, X., Montefiori, L., Verma-Gaur, J., Choi, N.M., Feeney, A.J., and Sen, R. (2015). A structural hierarchy mediated by multiple nuclear factors establishes IgH locus conformation. *Genes Dev.* *29*, 1683–1695.

Giallourakis, C.C., Franklin, A., Guo, C., Cheng, H.-L., Yoon, H.S., Gallagher, M., Perlot, T., Andzelm, M., Murphy, A.J., Macdonald, L.E., et al. (2010). Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22207–22212.

Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., and Birshtein, B.K. (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *150*, 1772–1780.

Gilliam, A.C., Shen, A., Richards, J.E., Blattner, F.R., Mushinski, J.F., and Tucker, P.W. (1984). Illegitimate recombination generates a class switch from C mu to C delta in an IgD-secreting plasmacytoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 4164–4168.

Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* *33*, 717–728.

Ginno, P.A., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I., and Chédin, F. (2012). R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol. Cell* *45*, 814–825.

Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* *33*, D256–D261.

- Gjörloff Wingren, A., Hadzic, R., Forsgren, A., and Riesbeck, K. (2002). The novel IgD binding protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B lymphocyte activation and Ig secretion in the presence of Th2 cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5582–5588.
- Goh, A.M., Coffill, C.R., and Lane, D.P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* *223*, 116–126.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., and Raphael, K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* *334*, 676–682.
- Gostissa, M., Yan, C.T., Bianco, J.M., Cogné, M., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2009). Long-range oncogenic activation of *Igh-c-myc* translocations by the *Igh* 3' regulatory region. *Nature* *462*, 803–807.
- Gostissa, M., Schwer, B., Chang, A., Dong, J., Meyers, R.M., Marecki, G.T., Choi, V.W., Chiarle, R., Zarrin, A.A., and Alt, F.W. (2014). IgH class switching exploits a general property of two DNA breaks to be joined in cis over long chromosomal distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2644–2649.
- Gramlich, H.S., Reisbig, T., and Schatz, D.G. (2012). AID-targeting and hypermutation of non-immunoglobulin genes does not correlate with proximity to immunoglobulin genes in germinal center B cells. *PloS One* *7*, e39601.
- Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* *481*, 306–313.
- Greenbaum, S., and Zhuang, Y. (2002). Identification of E2A target genes in B lymphocyte development by using a gene tagging-based chromatin immunoprecipitation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15030–15035.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* *446*, 153–158.

Gregor, P.D., and Morrison, S.L. (1986). Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1903–1916.

Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., et al. (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653–665.

Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003a). Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochim. Biophys. Acta* 1642, 181–190.

Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003b). Insulators to improve expression of a 3' IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 466–471.

Guglielmi, L., Truffinet, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003c). The beta-globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants. *Immunol. Lett.* 89, 119–123.

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* 14, 611–623.

Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20902–20907.

Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., et al. (2011a). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424–430.

Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., and Sen, R. (2011b). Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* 147, 332–343.

Guo, L., Zhang, X., Zheng, B., and Han, S. (2008). IgM-mediated signaling is required for the development of a normal B cell memory response. *Mol. Immunol.* *45*, 1071–1077.

Guo, L., Tian, J., Guo, Z., Zheng, B., and Han, S. (2011c). The absence of immunoglobulin D B cell receptor-mediated signals promotes the production of autoantibodies and exacerbates glomerulonephritis in murine lupus. *Clin. Exp. Immunol.* *164*, 227–235.

Habib, O., Habib, G., Do, J.T., Moon, S.-H., and Chung, H.-M. (2014). Activation-induced deaminase-coupled DNA demethylation is not crucial for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* *23*, 209–218.

Hackney, J.A., Misaghi, S., Senger, K., Garriss, C., Sun, Y., Lorenzo, M.N., and Zarrin, A.A. (2009). DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* *101*, 163–189.

Haddad, D., Oruc, Z., Puget, N., Laviolette-Malirat, N., Philippe, M., Carrion, C., Le Bert, M., and Khamlichi, A.A. (2011). Sense transcription through the S region is essential for immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J.* *30*, 1608–1620.

Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.-R., Jankovic, M., Oliveira, T., Bothmer, A., Voss, T.C., Ansarah-Sobrinho, C., et al. (2012). DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* *484*, 69–74.

Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* *5*, 645–650.

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., et al. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 57–64.

Hamlyn, P.H., and Rabbitts, T.H. (1983). Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* *304*, 135–139.

- Han, J.-H., Akira, S., Calame, K., Beutler, B., Selsing, E., and Imanishi-Kari, T. (2007). Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity* 27, 64–75.
- Han, S., Zhang, X., Xu, R., Finkelman, F.D., Brombacher, F., and Zheng, B. (2004). IgD+IgM- B cells mount immune responses that exhibit altered antibody repertoire. *Eur. J. Immunol.* 34, 661–668.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2012). Positive and negative selection of natural autoreactive B cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 750, 227–238.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity* 26, 703–714.
- Hartvigsen, K., Chou, M.-Y., Hansen, L.F., Shaw, P.X., Tsimikas, S., Binder, C.J., and Witztum, J.L. (2009). The role of innate immunity in atherogenesis. *J. Lipid Res.* 50 *Suppl*, S388–S393.
- Haughton, G., Arnold, L.W., Whitmore, A.C., and Clarke, S.H. (1993). B-1 cells are made, not born. *Immunol. Today* 14, 84–87; discussion 87–91.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S.A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C.L., Silver, J., and Hardy, R.R. (1999). Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285, 113–116.
- He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussell, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* 11, 836–845.
- Hein, K., Lorenz, M.G., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R., and Radbruch, A. (1998). Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188, 2369–2374.

- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.
- Helmink, B.A., and Sleckman, B.P. (2012). The Response to and Repair of RAG-Mediated DNA Double Stranded Breaks. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 175–202.
- Henseler, R.A., Romer, E.J., and Sulentic, C.E.W. (2009). Diverse chemicals including aryl hydrocarbon receptor ligands modulate transcriptional activity of the 3'immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Toxicology* 261, 9–18.
- Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1989). Toward a layered immune system. *Cell* 59, 953–954.
- Herzog, S., Hug, E., Meixlsperger, S., Paik, J.-H., DePinho, R.A., Reth, M., and Jumaa, H. (2008). SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K-PKB-Foxo pathway. *Nat. Immunol.* 9, 623–631.
- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205.
- Hirano, M., Das, S., Guo, P., and Cooper, M.D. (2011). The evolution of adaptive immunity in vertebrates. *Adv. Immunol.* 109, 125–157.
- Honjo, T., Reth, M., Radbruch, A., and Alt, F. (2014). *Molecular Biology of B Cells* (Elsevier).
- Hozumi, N., and Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3628–3632.
- Hsieh, P. (2012). DNA mismatch repair: Dr. Jekyll and Mr. Hyde? *Mol. Cell* 47, 665–666.
- Hung, T., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol.* 7, 582–585.

Hwang, J.K., Alt, F.W., and Yeap, L.-S. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3–MDNA0037 – 2014.

Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1975–1980.

Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 302–323.

Jankovic, M., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nat. Immunol.* 8, 801–808.

Jankovic, M., Robbiani, D.F., Dorsett, Y., Eisenreich, T., Xu, Y., Tarakhovsky, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Role of the translocation partner in protection against AID-dependent chromosomal translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 187–192.

Janz, S. (2006). Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair* 5, 1213–1224.

Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., and Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 208, 1649–1660.

Jendholm, J., Samuelsson, M., Cardell, L.-O., Forsgren, A., and Riesbeck, K. (2008). *Moraxella catarrhalis*-dependent tonsillar B cell activation does not lead to apoptosis but to vigorous proliferation resulting in nonspecific IgM production. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1370–1378.

Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J.M., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., and Murre, C. (2008). The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* 133, 265–279.

- Jiang, C., Foley, J., Clayton, N., Kissling, G., Jokinen, M., Herbert, R., and Diaz, M. (2007). Abrogation of lupus nephritis in activation-induced deaminase-deficient MRL/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7422–7431.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.
- Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., and Corcoran, A.E. (2006). Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4221–4234.
- Jones, J.M., and Gellert, M. (2002). Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. *EMBO J.* 21, 4162–4171.
- Ju, Z., Volpi, S.A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S.L., Gold, T., and Birshtein, B.K. (2007). Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* 282, 35169–35178.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and Control of V(d)j Recombination at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–570.
- Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.O., Stamato, T.D., and Roth, D.B. (1998). Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 5333–5342.
- Kadesch, T. (1992). Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Immunol. Today* 13, 31–36.
- Kaminski, D.A., and Stavnezer, J. (2006). Enhanced IgA class switching in marginal zone and B1 B cells relative to follicular/B2 B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 6025–6029.
- Kaminski, D.A., and Stavnezer, J. (2007). Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int. Immunol.* 19, 545–556.
- Kantor, A.B. (1996). V-gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Semin. Immunol.* 8, 29–35.

- Kantor, A.B., Merrill, C.E., Herzenberg, L.A., and Hillson, J.L. (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 1175–1186.
- Kao, Y.-P., Hsieh, W.-C., Hung, S.-T., Huang, C.-W., Lieber, M.R., and Huang, F.-T. (2013). Detection and characterization of R-loops at the murine immunoglobulin $\text{S}\alpha$ region. *Mol. Immunol.* *54*, 208–216.
- Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J.-Y., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., and Karasuyama, H. (2012). A Novel Mechanism for the Autonomous Termination of Pre-B Cell Receptor Expression via Induction of Lysosome-Associated Protein Transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4462–4471.
- Keats, J.J., Chesi, M., Egan, J.B., Garbitt, V.M., Palmer, S.E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P.R., Baker, A.S., Dispenzieri, A., et al. (2012). Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* *120*, 1067–1076.
- Kenter, A.L., Feldman, S., Wuerffel, R., Achour, I., Wang, L., and Kumar, S. (2012). Three-dimensional architecture of the IgH locus facilitates class switch recombination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1267*, 86–94.
- Khan, W.N. (2009). B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 3561–3567.
- Kiefer, K., Oshinsky, J., Kim, J., Nakajima, P.B., Bosma, G.C., and Bosma, M.J. (2007). The catalytic subunit of DNA-protein kinase (DNA-PKcs) is not required for Ig class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2843–2848.
- Kim, Y.-J., and Wilson, D.M. (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Curr. Mol. Pharmacol.* *5*, 3–13.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., and Gray, J.M. (2015). Enhancer RNAs: a class of long noncoding RNAs synthesized at enhancers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a018622.

- King, J.J., Manuel, C.A., Barrett, C.V., Raber, S., Lucas, H., Sutter, P., and Larijani, M. (2015). Catalytic pocket inaccessibility of activation-induced cytidine deaminase is a safeguard against excessive mutagenic activity. *Struct. Lond. Engl.* 1993 23, 615–627.
- Kitao, H., Kimura, M., Yamamoto, K., Seo, H., Namikoshi, K., Agata, Y., Ohta, K., and Takata, M. (2008). Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int. Immunol.* 20, 277–284.
- Klein, I.A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D.F., et al. (2011). Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 147, 95–106.
- Kluin, P.M., Kayano, H., Zani, V.J., Kluin-Nelemans, H.C., Tucker, P.W., Satterwhite, E., and Dyer, M.J. (1995). IgD class switching: identification of a novel recombination site in neoplastic and normal B cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 3504–3508.
- Kobayashi, M., Aida, M., Nagaoka, H., Begum, N.A., Kitawaki, Y., Nakata, M., Stanlie, A., Doi, T., Kato, L., Okazaki, I., et al. (2009). AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22375–22380.
- Koelsch, K., Zheng, N.-Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M.D., Jared, M., Smith, K., Capra, J.D., and Wilson, P.C. (2007). Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 117, 1558–1565.
- Kohli, R.M., Maul, R.W., Guminski, A.F., McClure, R.L., Gajula, K.S., Saribasak, H., McMahon, M.A., Siliciano, R.F., Gearhart, P.J., and Stivers, J.T. (2010). Local Sequence Targeting in the AID/APOBEC Family Differentially Impacts Retroviral Restriction and Antibody Diversification. *J. Biol. Chem.* 285, 40956–40964.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162.

- Kracker, S., and Radbruch, A. (2004). Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 271, 149–159.
- Krijger, P.H.L., Langerak, P., van den Berk, P.C.M., and Jacobs, H. (2009). Dependence of nucleotide substitutions on Ung2, Msh2, and PCNA-Ub during somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 206, 2603–2611.
- Kroese, F.G., de Waard, R., and Bos, N.A. (1996). B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin. Immunol.* 8, 11–18.
- Krokan, H.E., and Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012583.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J.* 6, 2267–2272.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell Res.* 242, 540–547.
- Kulik, L., Fleming, S.D., Moratz, C., Reuter, J.W., Novikov, A., Chen, K., Andrews, K.A., Markaryan, A., Quigg, R.J., Silverman, G.J., et al. (2009). Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5363–5373.
- Kumar, R., DiMenna, L., Schrode, N., Liu, T.-C., Franck, P., Muñoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A.-K., Zarrin, A.A., Chaudhuri, J., Elemento, O., et al. (2013). AID stabilizes stem cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* 500, 89–92.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 251–262.

- Kuraoka, M., Holl, T.M., Liao, D., Womble, M., Cain, D.W., Reynolds, A.E., and Kelsoe, G. (2011). Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11560–11565.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.
- Kurosawa, Y., von Boehmer, H., Haas, W., Sakano, H., Trauneker, A., and Tonegawa, S. (1981). Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* *290*, 565–570.
- Kwak, H., and Lis, J.T. (2013). Control of transcriptional elongation. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 483–508.
- Lans, H., Marteijn, J.A., and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* *5*, 4.
- Larijani, M., and Martin, A. (2007). Single-stranded DNA structure and positional context of the target cytidine determine the enzymatic efficiency of AID. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8038–8048.
- Larijani, M., Frieder, D., Sonbuchner, T.M., Bransteitter, R., Goodman, M.F., Bouhassira, E.E., Scharff, M.D., and Martin, A. (2005). Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination. *Mol. Immunol.* *42*, 599–604.
- Laurencikienė, J., Tamosiunas, V., and Severinson, E. (2007). Regulation of epsilon germline transcription and switch region mutations by IgH locus 3' enhancers in transgenic mice. *Blood* *109*, 159–167.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* *26*, 7741–7748.
- Lemaître, C., Grabarz, A., Tsouroula, K., Andronov, L., Furst, A., Pankotai, T., Heyer, V., Rogier, M., Attwood, K.M., Kessler, P., et al. (2014). Nuclear position dictates DNA repair pathway choice. *Genes Dev.* *28*, 2450–2463.

Li, F., and Eckhardt, L.A. (2009). A role for the IgH intronic enhancer E μ in enforcing allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 206, 153–167.

Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., and Eckhardt, L.A. (2010). Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E μ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 6049–6057.

Li, G., Zan, H., Xu, Z., and Casali, P. (2013a). Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* 34, 460–470.

Li, G., White, C.A., Lam, T., Pone, E.J., Tran, D.C., Hayama, K.L., Zan, H., Xu, Z., and Casali, P. (2013b). Combinatorial H3K9acS10ph histone modification in IgH locus S regions targets 14-3-3 adaptors and AID to specify antibody class-switch DNA recombination. *Cell Rep.* 5, 702–714.

Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* 100, 3077–3086.

Li, S.C., Rothman, P.B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D., and Alt, F.W. (1994). Expression of I μ -C γ hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* 6, 491–497.

Li, W., Lam, M.T.Y., and Notani, D. (2014). Enhancer RNAs. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 3151–3152.

Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.

Lieber, M.R., Yu, K., and Raghavan, S.C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair* 5, 1234–1245.

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping

of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293.

Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., and Eckhardt, L.A. (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* 19, 933–937.

Lieberson, R., Ong, J., Shi, X., and Eckhardt, L.A. (1995). Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. *EMBO J.* 14, 6229–6238.

Lin, D., Ippolito, G.C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsky, J., and Tucker, P. (2007). Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Mol. Cancer* 6, 23.

Lin, S.G., Guo, C., Su, A., Zhang, Y., and Alt, F.W. (2015). CTCF-binding elements 1 and 2 in the Igh intergenic control region cooperatively regulate V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1815–1820.

Lindsay, M.A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 29, 343–351.

Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.

Liu, Y.J., de Bouteiller, O., Arpin, C., Brière, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1996). Normal human IgD+IgM- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 4, 603–613.

Liubchenko, G.A., Appleberry, H.C., Holers, V.M., Banda, N.K., Willis, V.C., and Lyubchenko, T. (2012). Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile. *J. Autoimmun.* 38, 293–303.

Lorenz, M., Jung, S., and Radbruch, A. (1995). Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825–1828.

Løset, G.Å., Roux, K.H., Zhu, P., Michaelsen, T.E., and Sandlie, I. (2004). Differential segmental flexibility and reach dictate the antigen binding mode of chimeric IgD and IgM:

implications for the function of the B cell receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 2925–2934.

Lovec, H., Grzeschiczek, A., Kowalski, M.B., and Möröy, T. (1994). Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13, 3487–3495.

Lovely, G.A., Brewster, R.C., Schatz, D.G., Baltimore, D., and Phillips, R. (2015). Single-molecule analysis of RAG-mediated V(D)J DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1715–E1723.

Lu, Z.-P., Ju, Z.-L., Shi, G.-Y., Zhang, J.-W., and Sun, J. (2005). Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 204–209.

Lumsden, J.M., McCarty, T., Petiniot, L.K., Shen, R., Barlow, C., Wynn, T.A., Morse, H.C., Gearhart, P.J., Wynshaw-Boris, A., Max, E.E., et al. (2004). Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice. *J. Exp. Med.* 200, 1111–1121.

Luning Prak, E.T., Monestier, M., and Eisenberg, R.A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 96–121.

Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M.H., Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., Köhler, G., and Brombacher, F. (1998). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* 393, 797–801.

Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., and Lee, S.E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8820–8828.

MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139.

MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.

- Macpherson, A.J., and Slack, E. (2007). The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 673–678.
- Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* 8, 2212–2226.
- Magor, B.G., Ross, D.A., Pilström, L., and Warr, G.W. (1999). Transcriptional enhancers and the evolution of the IgH locus. *Immunol. Today* 20, 13–17.
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24, 353–365.
- Mani, R.-S., and Chinnaiyan, A.M. (2010). Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat. Rev. Genet.* 11, 819–829.
- Manis, J.P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., and Alt, F.W. (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188, 1421–1431.
- Manis, J.P., Morales, J.C., Xia, Z., Kutok, J.L., Alt, F.W., and Carpenter, P.B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 481–487.
- Mao, C., Jiang, L., Melo-Jorge, M., Puthenveetil, M., Zhang, X., Carroll, M.C., and Imanishi-Kari, T. (2004). T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype. *Immunity* 20, 133–144.
- Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.-M., Jäger, U., McBlane, F., and Nadel, B. (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair* 5, 1246–1258.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogné, M., and Pinaud, E. (2014). The E μ enhancer region influences H chain expression and

B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 1171–1183.

Mårtensson, I.-L., Rolink, A., Melchers, F., Mundt, C., Licence, S., and Shimizu, T. (2002). The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion. *Semin. Immunol.* *14*, 335–342.

Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* *584*, 2572–2579.

Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 323–335.

Martin, A., Chahwan, R., Parsa, J.Y., and Scharff, M.D. (2015). Chapter 20 - Somatic Hypermutation: The Molecular Mechanisms Underlying the Production of Effective High-Affinity Antibodies. In *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, F.W.A.H.R. Reth, ed. (London: Academic Press), pp. 363–388.

Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* *14*, 617–629.

Masani, S., Han, L., and Yu, K. (2013). Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Is the Essential Nuclease during Immunoglobulin Class Switch Recombination. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 1468–1473.

Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., and Chaudhuri, J. (2014a). Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* *122*, 1–57.

Matthews, A.J., Husain, S., and Chaudhuri, J. (2014b). Binding of AID to DNA does not correlate with mutator activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 252–257.

Matthias, P., and Baltimore, D. (1993). The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 1547–1553.

- Maul, R.W., and Gearhart, P.J. (2010). AID AND SOMATIC HYPERMUTATION. *Adv. Immunol.* *105*, 159–191.
- Maul, R.W., Cao, Z., Venkataraman, L., Giorgetti, C.A., Press, J.L., Denizot, Y., Du, H., Sen, R., and Gearhart, P.J. (2014). Spt5 accumulation at variable genes distinguishes somatic hypermutation in germinal center B cells from ex vivo-activated cells. *J. Exp. Med.* *211*, 2297–2306.
- Maul, R.W., Saribasak, H., Cao, Z., and Gearhart, P.J. (2015). Topoisomerase I deficiency causes RNA polymerase II accumulation and increases AID abundance in immunoglobulin variable genes. *DNA Repair* *30*, 46–52.
- Mauri, C., and Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.*
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* *83*, 387–395.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Tamir, I.M., Schwickert, T.A., Novatchkova, M., Sun, Q., Huis In 't Veld, P.J., Guo, C., Yoon, H.S., et al. (2013). Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* *39*, 229–244.
- Meek, K., Gupta, S., Ramsden, D.A., and Lees-Miller, S.P. (2004). The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol. Rev.* *200*, 132–141.
- Meng, F.-L., Alt, F.W., and Tian, M. (2015). Chapter 19 - The Mechanism of IgH Class Switch Recombination. In *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, F.W.A.H.R. Reth, ed. (London: Academic Press), pp. 345–362.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* *25*, 953–962.

Meyer, K.B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J., and Pettersson, S. (1995). Repression of the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site: implications for developmental control of enhancer function. *Eur. J. Immunol.* 25, 1770–1777.

Meyers, G., Ng, Y.-S., Bannock, J.M., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., Kilic, S.S., Aksu, G., Debré, M., Rieux-Laucat, F., et al. (2011). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11554–11559.

Michael, N., Shen, H.M., Longerich, S., Kim, N., Longacre, A., and Storb, U. (2003). The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* 19, 235–242.

Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshtein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 23, 975–981.

Michaelson, J.S., Singh, M., Snapper, C.M., Sha, W.C., Baltimore, D., and Birshtein, B.K. (1996). Regulation of 3' IgH enhancers by a common set of factors, including kappa B-binding proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 2828–2839.

Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110–113.

Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M., and Max, E.E. (1997). Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J. Exp. Med.* 186, 845–858.

Miron, K., Golan-Lev, T., Dvir, R., Ben-David, E., and Kerem, B. (2015). Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. *Nat. Commun.* 6, 7094.

Miyagaki, T., Fujimoto, M., and Sato, S. (2015). Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *Int. Immunol.*

- Miyazaki, K., Miyazaki, M., and Murre, C. (2014). The Establishment of B versus T Cell Identity. *Trends Immunol.* 35, 205–210.
- Mocikat, R., Harloff, C., and Kütemeier, G. (1993). The effect of the rat immunoglobulin heavy-chain 3' enhancer is position dependent. *Gene* 136, 349–353.
- Mocikat, R., Kardinal, C., and Klobeck, H.G. (1995). Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain mu intron and 3' enhancer. *Eur. J. Immunol.* 25, 3195–3198.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13–21.
- Moore, K.W., Rogers, J., Hunkapiller, T., Early, P., Nottenburg, C., Weissman, I., Bazin, H., Wall, R., and Hood, L.E. (1981). Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1800–1804.
- Moore, M.W., Durdik, J., Persiani, D.M., and Selsing, E. (1985). Deletions of kappa chain constant region genes in mouse lambda chain-producing B cells involve intrachromosomal DNA recombinations similar to V-J joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6211–6215.
- Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* 279, 52353–52360.
- Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., and Cogné, M. (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102, 1421–1427.
- Moskophidis, D., Moskophidis, M., and Löhler, J. (1997). Virus-specific IgD in acute viral infection of mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 1254–1261.
- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Rajewsky, K. (2004). The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539–544.

Mountz, J.D., Mushinski, J.F., Owens, J.D., and Finkelman, F.D. (1990). The in vivo generation of murine IgD-secreting cells is accompanied by deletion of the C mu gene and occasional deletion of the gene for the C delta 1 domain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *145*, 1583–1591.

Mukherjee, S., Zhu, J., Zikherman, J., Parameswaran, R., Kadlecsek, T.A., Wang, Q., Au-Yeung, B., Ploegh, H., Kuriyan, J., Das, J., et al. (2013). Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases. *Sci. Signal.* *6*, ra1.

Mulders-Manders, C.M., and Simon, A. (2015). Hyper-IgD syndrome/mevalonate kinase deficiency: what is new? *Semin. Immunopathol.* *37*, 371–376.

Mundy, C.L., Patenge, N., Matthews, A.G.W., and Oettinger, M.A. (2002). Assembly of the RAG1/RAG2 synaptic complex. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 69–77.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.

Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M., et al. (1998). Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J.* *17*, 5734–5743.

Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2000). Isolation, Tissue Distribution, and Chromosomal Localization of the Human Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Gene. *Genomics* *68*, 85–88.

Nabel, C.S., Manning, S.A., and Kohli, R.M. (2012a). The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem. Biol.* *7*, 20–30.

Nabel, C.S., Jia, H., Ye, Y., Shen, L., Goldschmidt, H.L., Stivers, J.T., Zhang, Y., and Kohli, R.M. (2012b). AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 751–758.

Nabel, C.S., Lee, J.W., Wang, L.C., and Kohli, R.M. (2013). Nucleic acid determinants for selective deamination of DNA over RNA by activation-induced deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14225–14230.

Nagaoka, H., Tran, T.H., Kobayashi, M., Aida, M., and Honjo, T. (2010). Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *Int. Immunol.* 22, 227–235.

Nakama, M., Kawakami, K., Kajitani, T., Urano, T., and Murakami, Y. (2012). DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 17, 218–233.

Neurath, M.F., Strober, W., and Wakatsuki, Y. (1994). The murine Ig 3' alpha enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S alpha-BP). *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 730–742.

Neurath, M.F., Max, E.E., and Strober, W. (1995). Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5336–5340.

Nicolás, L., and Chaudhuri, J. (2013). 4C-ing the Igh Landscape. *Immunity* 39, 199–201.

Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956.

Nitschke, L., Kosco, M.H., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1993). Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1887–1891.

Noia, J.M.D., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.

Nowak, U., Matthews, A.J., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). The splicing regulator PTBP2 interacts with the cytidine deaminase AID and promotes binding of AID to switch-region DNA. *Nat. Immunol.* *12*, 160–166.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.

Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., and Li, G.C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* *382*, 551–555.

Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* *26*, 715–725.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.

Odegard, V.H., Kim, S.T., Anderson, S.M., Shlomchik, M.J., and Schatz, D.G. (2005). Histone modifications associated with somatic hypermutation. *Immunity* *23*, 101–110.

Ohta, Y., and Flajnik, M. (2006). IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10723–10728.

Okada, T., and Cyster, J.G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 278–285.

Okazaki, I., Kotani, A., and Honjo, T. (2007). Role of AID in tumorigenesis. *Adv. Immunol.* *94*, 245–273.

Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G., and Eckhardt, L.A. (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 4896–4903.

Oretti, C., Barbi, E., Marchetti, F., Lepore, L., Ventura, A., D’Osualdo, A., Gattorno, M., Martellosi, S., and Tommasini, A. (2006). Diagnostic challenge of hyper-IgD syndrome in four children with inflammatory gastrointestinal complaints. *Scand. J. Gastroenterol.* *41*, 430–436.

O’Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* *11*, 21–31.

Owens, J.D., Finkelman, F.D., Mountz, J.D., and Mushinski, J.F. (1991). Nonhomologous recombination at sites within the mouse JH-C delta locus accompanies C mu deletion and switch to immunoglobulin D secretion. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5660–5670.

Ozeri-Galai, E., Tur-Sinai, M., Bester, A.C., and Kerem, B. (2014). Interplay between genetic and epigenetic factors governs common fragile site instability in cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 4495–4506.

Packard, T.A., and Cambier, J.C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000prime Rep.* *5*, 40.

Pan-Hammarström, Q., Jones, A.-M., Lähdesmäki, A., Zhou, W., Gatti, R.A., Hammarström, L., Gennery, A.R., and Ehrenstein, M.R. (2005). Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J. Exp. Med.* *201*, 189–194.

Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J., and Granner, D.K. (1984). Structure of the 5’ ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 2650–2654.

Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H., and Dalla-Favera, R. (2006). PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 395–400.

Patenaude, A.-M., and Di Noia, J.M. (2010). The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucl. Austin Tex* *1*, 325–331.

Pavlicek, J.W., Lyubchenko, Y.L., and Chang, Y. (2008). Quantitative Analyses of RAG-RSS Interactions and Conformations Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 11204–11211.

Pawlitzky, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., and Brodeur, P.H. (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5’ flanking region of the

mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 6839–6851.

Pefanis, E., Wang, J., Rothschild, G., Lim, J., Kazadi, D., Sun, J., Federation, A., Chao, J., Elliott, O., Liu, Z.-P., et al. (2015). RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* *161*, 774–789.

Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The Biochemistry of Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481–511.

Peng, C., and Eckhardt, L.A. (2013). Role of the Igh intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 4399–4411.

Pepper, J.W., Scott Findlay, C., Kassen, R., Spencer, S.L., and Maley, C.C. (2009). Cancer research meets evolutionary biology. *Evol. Appl.* *2*, 62–70.

Perlot, T., and Alt, F.W. (2008). Cis-Regulatory Elements and Epigenetic Changes Control Genomic Rearrangements of the IgH Locus. *Adv. Immunol.* *99*, 1–32.

Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14362–14367.

Perlot, T., Li, G., and Alt, F.W. (2008). Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3843–3848.

Perlot, T., Pawlitzky, I., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Brodeur, P.H., and Alt, F.W. (2010). Analysis of mice lacking DNaseI hypersensitive sites at the 5' end of the IgH locus. *PloS One* *5*, e13992.

Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.

Peters, A., and Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* *4*, 57–65.

- Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T., and Neuberger, M.S. (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* *344*, 165–168.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* *424*, 103–107.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 959–971.
- Pike, B.L., Boyd, A.W., and Nossal, G.J. (1982). Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2013–2017.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 767–777.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C., and Cogné, M. (1997). Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2981–2985.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* *15*, 187–199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* *110*, 27–70.
- Pioli, P.D., Debnath, I., Weis, J.J., and Weis, J.H. (2014). Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the Ighm/Ighd locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 2546–2553.
- Pon, J.R., and Marra, M.A. (2015). Driver and passenger mutations in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *10*, 25–50.

- Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., et al. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* *3*, 767.
- Pott, S., and Lieb, J.D. (2015). What are super-enhancers? *Nat. Genet.* *47*, 8–12.
- Preud'homme, J.L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J.C., and Lelièvre, E. (2000). Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol. Immunol.* *37*, 871–887.
- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* *455*, 764–769.
- Quinodoz, S., and Guttman, M. (2014). Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization. *Trends Cell Biol.* *24*, 651–663.
- Racine, R., and Winslow, G.M. (2009). IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol. Lett.* *125*, 79–85.
- Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., and Milstein, C. (1998). Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* *9*, 135–141.
- Rada, C., Jarvis, J.M., and Milstein, C. (2002a). AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7003–7008.
- Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., and Neuberger, M.S. (2002b). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol. CB* *12*, 1748–1755.
- Ramiro, A.R., and Barreto, V.M. (2015). Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 172–181.

Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431–438.

Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., et al. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440, 105–109.

Ray, A., Wang, L., and Dittel, B.N. (2015). IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int. Immunol.*

Reina-San-Martin, B., Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2003). H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 197, 1767–1778.

Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J. Exp. Med.* 200, 1103–1110.

Reth, M.G., and Alt, F.W. (1984). Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 312, 418–423.

Reth, M., and Nielsen, P. (2014). Chapter Four - Signaling Circuits in Early B-Cell Development. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 129–175.

Rincón-Arévalo, H., Sanchez-Parra, C.C., Castaño, D., Yassin, L., and Vásquez, G. (2015). Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int. Rev. Immunol.*

Robbiani, D.F., and Nussenzweig, M.C. (2013). Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Annu. Rev. Pathol.* 8, 79–103.

Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 981–993.

- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012). Close proximity to Igh is a contributing factor to AID-mediated translocations. *Mol. Cell* 47, 873–885.
- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2013). Response to Casellas et al. *Mol. Cell* 51, 277–278.
- Roes, J., and Rajewsky, K. (1991). Cell autonomous expression of IgD is not essential for the maturation of conventional B cells. *Int. Immunol.* 3, 1367–1371.
- Roes, J., and Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J. Exp. Med.* 177, 45–55.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.
- Rogozin, I.B., Iyer, L.M., Liang, L., Glazko, G.V., Liston, V.G., Pavlov, Y.I., Aravind, L., and Pancer, Z. (2007). Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat. Immunol.* 8, 647–656.
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6, 31–41.
- Rolink, A.G., Winkler, T., Melchers, F., and Andersson, J. (2000). Precursor B Cell Receptor–Dependent B Cell Proliferation and Differentiation Does Not Require the Bone Marrow or Fetal Liver Environment. *J. Exp. Med.* 191, 23–32.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Li, Z., Martin, A., and Scharff, M.D. (2007). Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 204, 181–190.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2012a). Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287, 8356–8360.

- Rouaud, P., Fiancette, R., Vincent-Fabert, C., Magnone, V., Cogné, M., Dubus, P., and Denizot, Y. (2012b). Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53^{+/-} mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* 3, 586–593.
- Rowe, D.S., Hug, K., Forni, L., and Pernis, B. (1973). Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. *J. Exp. Med.* 138, 965–972.
- Rowley, J.D. (1973a). Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann. Génétique* 16, 109–112.
- Rowley, J.D. (1973b). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.
- Roy, A.L., Sen, R., and Roeder, R.G. (2011). Enhancer-promoter communication and transcriptional regulation of Igh. *Trends Immunol.* 32, 532–539.
- Roy, D., Yu, K., and Lieber, M.R. (2008). Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Mol. Cell. Biol.* 28, 50–60.
- Roy, D., Zhang, Z., Lu, Z., Hsieh, C.-L., and Lieber, M.R. (2010). Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site. *Mol. Cell. Biol.* 30, 146–159.
- Ruan, M.R., Akkoyunlu, M., Grubb, A., and Forsgren, A. (1990). Protein D of *Haemophilus influenzae*. A novel bacterial surface protein with affinity for human IgD. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 145, 3379–3384.
- Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelandra, R., and Torres, R.M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 3882–3888.
- Russell, D.M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J.F., Bürki, K., and Nemazee, D. (1991). Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354, 308–311.

- Saad, F., Saintamand, A., Rouaud, P., and Denizot, Y. (2014). Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the in vivo inflammatory response in mice. *Oncoscience* 1, 591–598.
- Sakaguchi, N., and Melchers, F. (1986). Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 324, 579–582.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B.P., and Alt, F.W. (1999). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1526–1531.
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., and Tonegawa, S. (1981). Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 290, 562–565.
- Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., and Birshtein, B.K. (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J. Immunol. Baltim. Md* 150 158, 4780–4787.
- Saleque, S., Singh, M., and Birshtein, B.K. (1999). Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J. Immunol. Baltim. Md* 150 162, 2791–2803.
- Sanchez, P., Nadel, B., and Cazenave, P.A. (1991). V lambda-J lambda rearrangements are restricted within a V-J-C recombination unit in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 21, 907–911.
- Sandel, P.C., and Monroe, J.G. (1999). Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289–299.
- Saribasak, H., and Gearhart, P.J. (2012). Does DNA repair occur during somatic hypermutation? *Semin. Immunol.* 24, 287–292.
- Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J.L., Rajewsky, K., and Schmidt-Suprian, M. (2004). TNF Family Member B Cell-Activating Factor (BAFF) Receptor-Dependent and -Independent Roles for BAFF in B Cell Physiology. *J. Immunol.* 173, 2245–2252.

- Sawchuk, D.J., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M.C., and Cortes, P. (1997). V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J. Exp. Med.* 185, 2025–2032.
- Schatz, D.G., and Spanopoulou, E. (2005). Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 290, 49–85.
- Schilling, J., Clevinger, B., Davie, J.M., and Hood, L. (1980). Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* 283, 35–40.
- Schlissel, M.S. (2004). Regulation of activation and recombination of the murine Igkappa locus. *Immunol. Rev.* 200, 215–223.
- Schmidt, E.V., Pattengale, P.K., Weir, L., and Leder, P. (1988). Transgenic mice bearing the human c-myc gene activated by an immunoglobulin enhancer: a pre-B-cell lymphoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6047–6051.
- Schneider, R., and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21, 3027–3043.
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.-L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., et al. (1999). BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. *J. Exp. Med.* 189, 1747–1756.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–S52.
- Seidl, K.J., Manis, J.P., Bottaro, A., Zhang, J., Davidson, L., Kisselgof, A., Oettgen, H., and Alt, F.W. (1999). Position-dependent inhibition of class-switch recombination by PGK-neor cassettes inserted into the immunoglobulin heavy chain constant region locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3000–3005.

Seidman, J.G., Leder, A., Edgell, M.H., Polsky, F., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., and Leder, P. (1978). Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3881–3885.

Seifert, M., Scholtysik, R., and Küppers, R. (2013). Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 971, 1–25.

Sen, R., and Oltz, E. (2006). Genetic and epigenetic regulation of IgH gene assembly. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 237–242.

Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., and Birshstein, B.K. (2005). Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615.

Serwe, M., and Sablitzky, F. (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* 12, 2321–2327.

Shaw, P.X., Hörkkö, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., and Witztum, J.L. (2000). Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest.* 105, 1731–1740.

Shimamoto, R., Amano, N., Ichisaka, T., Watanabe, A., Yamanaka, S., and Okita, K. (2014). Generation and characterization of induced pluripotent stem cells from Aid-deficient mice. *PloS One* 9, e94735.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.

- Shinkura, R., Ito, S., Begum, N.A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., and Honjo, T. (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 707–712.
- Singh, M., and Birshstein, B.K. (1996). Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' alpha E(hs1,2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4392–4397.
- Singh, K., Nordström, T., Mörgelin, M., Brant, M., Cardell, L.-O., and Riesbeck, K. (2014). *Haemophilus influenzae* resides in tonsils and uses immunoglobulin D binding as an evasion strategy. *J. Infect. Dis.* 209, 1418–1428.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., et al. (2001). Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2, 848–854.
- Skourti-Stathaki, K., and Proudfoot, N.J. (2014). A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev.* 28, 1384–1396.
- Skourti-Stathaki, K., Kamieniarz-Gdula, K., and Proudfoot, N.J. (2014). R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature* 516, 436–439.
- Slingerland, M., Guchelaar, H.-J., and Gelderblom, H. (2014). Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer. Drugs* 25, 140–149.
- Song, H., and Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J. Exp. Med.* 198, 1923–1935.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793.
- Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Olivier-Martin, C., Goujet-Zalc, C., Charneau, P., and de Villartay, J.-P. (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 204, 1717–1727.

- Staszewski, O., Baker, R.E., Ucher, A.J., Martier, R., Stavnezer, J., and Guikema, J.E.J. (2011a). Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Mol. Cell* 41, 232–242.
- Staszewski, O., Baker, R.E., Ucher, A.J., Martier, R., Stavnezer, J., and Guikema, J.E.J. (2011b). Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Mol. Cell* 41, 232–242.
- Stavnezer, J. (2000). Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 127–168.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5370–5378.
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A., and Pan-Hammarström, Q. (2010). Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* 108, 45–109.
- Storb, U., Haasch, D., Arp, B., Sanchez, P., Cazenave, P.A., and Miller, J. (1989). Physical linkage of mouse lambda genes by pulsed-field gel electrophoresis suggests that the rearrangement process favors proximate target sequences. *Mol. Cell. Biol.* 9, 711–718.
- Stubbington, M.J.T., and Corcoran, A.E. (2013). Non-coding transcription and large-scale nuclear organisation of immunoglobulin recombination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 81–88.
- Sun, X.H. (1994). Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893–900.
- Sun, T., and Storb, U. (2001). Insertion of phosphoglycerine kinase (PGK)-neo 5' of Jlambda1 dramatically enhances VJlambda1 rearrangement. *J. Exp. Med.* 193, 699–712.
- Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Dean, C. (2013). R-loop stabilization represses antisense transcription at the Arabidopsis FLC locus. *Science* 340, 619–621.

- Ta, V.-T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., et al. (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* *4*, 843–848.
- Taccioli, G.E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P.A., and Alt, F.W. (1993). Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* *260*, 207–210.
- Tanaka, A., Shen, H.M., Ratnam, S., Kodgire, P., and Storb, U. (2010). Attracting AID to targets of somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *207*, 405–415.
- Tang, H., and Sharp, P.A. (1999). Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity* *11*, 517–526.
- Tantin, D., Tussie-Luna, M.I., Roy, A.L., and Sharp, P.A. (2004). Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J. Biol. Chem.* *279*, 5460–5469.
- Tarlinton, D.M., McLean, M., and Nossal, G.J. (1995). B1 and B2 cells differ in their potential to switch immunoglobulin isotype. *Eur. J. Immunol.* *25*, 3388–3393.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7837–7841.
- Taylor, J.G., and Gribben, J.G. (2015). Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin. Cancer Biol.* *34*, 36–45.
- Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., and Farris, A.D. (2007). Cutting Edge: Transitional T3 B Cells Do Not Give Rise to Mature B Cells, Have Undergone Selection, and Are Reduced in Murine Lupus. *J. Immunol.* *178*, 7511–7515.

- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621–629.
- Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N., and Azuma, T. (2001). A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 811–820.
- Thiebe, R., Schäble, K.F., Bensch, A., Brensing-Küppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Mitlöhner, H., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Röschenthaler, F., et al. (1999). The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus. *Eur. J. Immunol.* 29, 2072–2081.
- Thomas, M., White, R.L., and Davis, R.W. (1976). Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2294–2298.
- Thomas-Claudepierre, A.-S., Schiavo, E., Heyer, V., Fournier, M., Page, A., Robert, I., and Reina-San-Martin, B. (2013). The cohesin complex regulates immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 210, 2495–2502.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177, 1009–1020.
- Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2012). Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32, 107–117.
- Treiber, T., Mandel, E.M., Pott, S., Györy, I., Firner, S., Liu, E.T., and Grosschedl, R. (2010). Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription-independent poising of chromatin. *Immunity* 32, 714–725.
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogné, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogné, M., and Denizot, Y. (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 6033–6042.

Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., et al. (2014). Environments of B cell development. *Immunol. Lett.* *157*, 60–63.

Übelhart, R., Hug, E., Bach, M.P., Wossning, T., Dühren-von Minden, M., Horn, A.H.C., Tsiantoulas, D., Kometani, K., Kurosaki, T., Binder, C.J., et al. (2015). Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD. *Nat. Immunol.* *16*, 534–543.

Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., and Kelsoe, G. (2007). T-Independent Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression, Class-Switch Recombination, and Antibody Production by Immature/Transitional 1 B Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 3593–3601.

Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., and Chaudhuri, J. (2014). AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front. Immunol.* *5*, 120.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2009a). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6926–6932.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2009b). Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene. *Leuk. Res.* *33*, e203–e206.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010a). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* *116*, 1895–1898.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2010b). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3306–3311.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138–141.

Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Will, B., Steidl, U., et al. (2012). Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 2556–2566.

Vossenkämper, A., Lutalo, P.M.K., and Spencer, J. (2012). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Transitional B cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: clinical implications and effects of B cell-targeted therapies. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 7–14.

Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S., and Chaudhuri, J. (2009). Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **10**, 420–426.

Wahba, L., Gore, S.K., and Koshland, D. (2013). The homologous recombination machinery modulates the formation of RNA-DNA hybrids and associated chromosome instability. *eLife* **2**, e00505.

Waibel, M., Christiansen, A.J., Hibbs, M.L., Shortt, J., Jones, S.A., Simpson, I., Light, A., O'Donnell, K., Morand, E.F., Tarlinton, D.M., et al. (2015). Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat. Commun.* **6**, 6838.

Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., Max, E.E., and Strober, W. (1994). The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J. Exp. Med.* **179**, 1099–1108.

Wang, J., and Boxer, L.M. (2005). Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 12766–12773.

Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., and Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **206**, 1817–1830.

- Wang, Q., Oliveira, T., Jankovic, M., Silva, I.T., Hakim, O., Yao, K., Gazumyan, A., Mayer, C.T., Pavri, R., Casellas, R., et al. (2014a). Epigenetic targeting of activation-induced cytidine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 18667–18672.
- Wang, X., Fan, M., Kalis, S., Wei, L., and Scharff, M.D. (2014b). A source of the single-stranded DNA substrate for activation-induced deaminase during somatic hypermutation. *Nat. Commun.* *5*, 4137.
- Ward, I.M., Reina-San-Martin, B., Olaru, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J.S., Cascalho, M., Chen, L., Nussenzweig, A., Livak, F., et al. (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *J. Cell Biol.* *165*, 459–464.
- Wartman, L.D., Larson, D.E., Xiang, Z., Ding, L., Chen, K., Lin, L., Cahan, P., Klco, J.M., Welch, J.S., Li, C., et al. (2011). Sequencing a mouse acute promyelocytic leukemia genome reveals genetic events relevant for disease progression. *J. Clin. Invest.* *121*, 1445–1455.
- Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J., and Hood, L. (1978). Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* *276*, 785–790.
- Welinder, E., Åhsberg, J., and Sigvardsson, M. (2011). B-lymphocyte commitment: Identifying the point of no return. *Semin. Immunol.* *23*, 335–340.
- White, M.B., Word, C.J., Humphries, C.G., Blattner, F.R., and Tucker, P.W. (1990). Immunoglobulin D switching can occur through homologous recombination in human B cells. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 3690–3699.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* *153*, 307–319.
- Wienands, J., and Reth, M. (1992). Glycosyl-phosphatidylinositol linkage as a mechanism for cell-surface expression of immunoglobulin D. *Nature* *356*, 246–248.
- Wiesendanger, M., Kneitz, B., Edelmann, W., and Scharff, M.D. (2000). Somatic hypermutation in MutS homologue (MSH)3-, MSH6-, and MSH3/MSH6-deficient mice

reveals a role for the MSH2-MSH6 heterodimer in modulating the base substitution pattern. *J. Exp. Med.* *191*, 579–584.

Wijesinghe, P., and Bhagwat, A.S. (2012). Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9206–9217.

Woo, C.J., Martin, A., and Scharff, M.D. (2003). Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity* *19*, 479–489.

Wright, B.E., Schmidt, K.H., Davis, N., Hunt, A.T., and Minnick, M.F. (2008). II. Correlations between secondary structure stability and mutation frequency during somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* *45*, 3600–3608.

Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007). S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* *27*, 711–722.

Xu, B., Wang, J., Zhang, M., Wang, P., Wei, Z., Sun, Y., Tao, Q., Ren, L., Hu, X., Guo, Y., et al. (2012a). Expressional analysis of immunoglobulin D in cattle (*Bos taurus*), a large domesticated ungulate. *PloS One* *7*, e44719.

Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L.M., Al-Qahtani, A., White, C.A., Park, S.-R., et al. (2010). 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1124–1135.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012b). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 517–531.

Xue, K., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2006). The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in *msh2*^{-/-} *ung*^{-/-} mice. *J. Exp. Med.* *203*, 2085–2094.

- Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., and Casellas, R. (2011). Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 12, 62–69.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482.
- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 40, 271–281.
- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 339–368.
- Yang, L., Froberg, J.E., and Lee, J.T. (2014). Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* 39, 35–43.
- Yang, Q., Riblet, R., and Schildkraut, C.L. (2005). Sites that direct nuclear compartmentalization are near the 5' end of the mouse immunoglobulin heavy-chain locus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6021–6030.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* 4, 442–451.
- Zaller, D.M., and Eckhardt, L.A. (1985). Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5088–5092.
- Zan, H., and Casali, P. (2013). Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity* 46, 83–101.
- Zandi, S., Åhsberg, J., Tsapogas, P., Stjernberg, J., Qian, H., and Sigvardsson, M. (2012). Single-cell analysis of early B-lymphocyte development suggests independent regulation of

lineage specification and commitment in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 15871–15876.

Zaprazna, K., and Atchison, M.L. (2012). YY1 controls immunoglobulin class switch recombination and nuclear activation-induced deaminase levels. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1542–1554.

Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 1275–1281.

Zarrin, A.A., Del Vecchio, C., Tseng, E., Gleason, M., Zarin, P., Tian, M., and Alt, F.W. (2007a). Antibody class switching mediated by yeast endonuclease-generated DNA breaks. *Science* *315*, 377–381.

Zarrin, A.A., Vecchio, C.D., Tseng, E., Gleason, M., Zarin, P., Tian, M., and Alt, F.W. (2007b). Antibody Class Switching Mediated by Yeast Endonuclease-Generated DNA Breaks. *Science* *315*, 377–381.

Zha, S., Boboila, C., and Alt, F.W. (2009). Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 798–800.

Zhang, Q., Iida, R., Yokota, T., and Kincade, P.W. (2013). Early events in lymphopoiesis: an update. *Curr. Opin. Hematol.* *20*, 265–272.

Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., and Alt, F.W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv. Immunol.* *106*, 93–133.

Zhang, Y., McCord, R.P., Ho, Y.-J., Lajoie, B.R., Hildebrand, D.G., Simon, A.C., Becker, M.S., Alt, F.W., and Dekker, J. (2012). Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* *148*, 908–921.

Zhang, Y., Gallastegui, N., and Rosenblatt, J.D. (2015). Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int. Immunol.*

Zhang, Z., Burrows, P.D., and Cooper, M.D. (2004). The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunol. Rev.* 197, 231–242.

Zhang, Z.Z., Pannunzio, N.R., Hsieh, C.-L., Yu, K., and Lieber, M.R. (2014a). The role of G-density in switch region repeats for immunoglobulin class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* 42, 13186–13193.

Zhang, Z.Z., Pannunzio, N.R., Han, L., Hsieh, C.-L., Yu, K., and Lieber, M.R. (2014b). The strength of an Ig switch region is determined by its ability to drive R loop formation and its number of WGCW sites. *Cell Rep.* 8, 557–569.

Zheng, N.-Y., Wilson, K., Wang, X., Boston, A., Kolar, G., Jackson, S.M., Liu, Y.-J., Pascual, V., Capra, J.D., and Wilson, P.C. (2004). Human immunoglobulin selection associated with class switch and possible tolerogenic origins for C δ class-switched B cells. *J. Clin. Invest.* 113, 1188–1201.

Zheng, S., Vuong, B.Q., Vaidyanathan, B., Lin, J.-Y., Huang, F.-T., and Chaudhuri, J. (2015). Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell* 161, 762–773.

Zhou, J., Ashouian, N., Delepine, M., Matsuda, F., Chevillard, C., Riblet, R., Schildkraut, C.L., and Birshtein, B.K. (2002). The origin of a developmentally regulated Igh replicon is located near the border of regulatory domains for Igh replication and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13693–13698.

Zhu, C., Mills, K.D., Ferguson, D.O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C.C., and Alt, F.W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 109, 811–821.

Zhu, L., Yan, Z., Feng, M., Peng, D., Guo, Y., Hu, X., Ren, L., and Sun, Y. (2014). Identification of sturgeon IgD bridges the evolutionary gap between elasmobranchs and teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 138–147.

Zikherman, J., Parameswaran, R., and Weiss, A. (2012). Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* 489, 160–164.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1, a001883.

Résumé

Durant l'ontogénie B, le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus de réarrangements géniques. Lors des phases précoces du développement B, indépendamment de la rencontre avec un antigène, les réarrangements VDJ permettent l'obtention d'un répertoire d'Ig fonctionnelles. Lors des phases tardives, l'hypermutation somatique (SHM) permet l'augmentation de l'affinité de l'Ig pour son antigène tandis que la recombinaison isotypique (CSR) modifie ses fonctions effectrices. Ces événements impliquent l'induction de lésions de l'ADN potentiellement oncogéniques, ce qui impose une régulation très stricte. Cette régulation est assurée par divers éléments *cis*-régulateurs répartis tout au long du locus IgH, dont la région régulatrice en 3' (3'RR). La 3'RR s'étend sur 30 kb et contient quatre activateurs transcriptionnels, les trois premiers formant une structure palindromique. Lors de ma thèse, j'ai utilisé plusieurs modèles murins porteurs de délétions de tout ou partie de la 3'RR pour étudier son rôle, ainsi que celui des différents éléments qui la compose lors des diverses étapes de l'ontogénie B. Nous avons pu déterminer comment la 3'RR régule précisément la CSR en ciblant spécifiquement la région *switch* acceptrice et caractériser le phénomène encore peu connu de CSR vers IgD. D'autre part, nous avons démontré l'importance de la 3'RR lors de la SHM et dans le développement des différentes sous populations lymphocytaires B. Enfin, la comparaison des résultats obtenus lors de l'analyse des différents modèles nous a permis de déterminer que la structure palindromique de la 3'RR est importante pour une SHM efficace, mais relativement dispensable lors de la CSR.

Mots clés :

Locus IgH / Ontogénie B / 3'RR / Hypermutations somatique / recombinaison isotypique

Abstract

During B-cell development, the immunoglobulin heavy chains locus (IgH) undergoes three genic rearrangement events. During the early stages, before encountering the antigen, VDJ rearrangements allow the generation of a functional Ig repertoire. During the late stages, somatic hypermutation (SHM) increases the affinity of the Ig for its antigen, while class switch recombination (CSR) modifies its effector functions. These events imply the generation of potentially oncogenic DNA lesions, and thus require a strict regulation. This regulation is assured by several *cis*-regulatory elements spread along the IgH locus, including the 3' regulatory region (3'RR). The 3'RR extends on more than 30kb and contains four transcriptional enhancers, the first three displaying a palindromic conformation. During my PhD, I investigated several mouse models carrying deletion of part or totality of the 3'RR to investigate its role during B cell development. We demonstrated how she precisely regulates CSR by specifically targeting the acceptor switch region, and described the poorly known mechanism of CSR toward IgD. Otherwise, we have demonstrated its importance during SHM and in the correct development of the different B cell subpopulations. Finally, by comparing the results obtained during the analysis of the various mouse models, we have demonstrated that the palindromic structure of the 3'RR is required for optimal SHM, but not for CSR.

Keywords:

IgH locus / B cell development / 3'RR / Somatic hypermutations / Class switch recombination